

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIOGO MACIEL DE MAGALHÃES

ANÁLISE PROTEÔMICA DE CITRUMELO 'SWINGLE' (*Citrus paradisi*
Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) COM ALTO
ACÚMULO DE PROLINA EM SITUAÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO

CURITIBA
2009

DIOGO MACIEL DE MAGALHÃES

ANÁLISE PROTEÔMICA DE CITRUMELO 'SWINGLE' (*Citrus paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA EM SITUAÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho

Coorientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

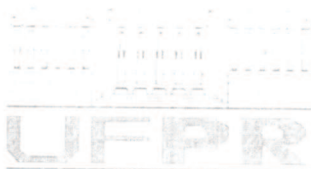
**CURITIBA
2009**

M188 Magalhães, Diogo Maciel de.
Análise proteômica de citrumelo 'swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. com alto acúmulo de prolina em situação de déficit hídrico /
Diogo Maciel de Magalhães. – Curitiba, 2009
120 f. : il. : color

Orientador: João Carlos Bessalho Filho
Co-orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal

1. Citrumelo – Melhoramento genético. 2. Plantas transgênicas. 3. Porta-enxertos. 4. Citricultura. I. Bessalho Filho, João Carlos. II. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção vegetal. IV. Título.

CDU 631.541.4:634.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **DIOGO MACIEL DE MAGALHÃES**, sob o título "**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CITRUMELO 'SWINGLE' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA EM SITUAÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 31 de Julho de 2009

Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
Primeiro Examinador

Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
Segundo Examinador

Professor Dr. João Carlos Bessalho Filho
Presidente da Banca e Orientador

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná pela possibilidade de realizar o mestrado.

Ao Programa REUNI pela concessão da bolsa.

Ao professor Dr. João Carlos Bespalhok Filho, pela orientação e dedicação.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, pela co-orientação e amizade. Seu extraordinário conhecimento científico acerca dos assuntos relacionados à biologia molecular de plantas contribuiu não apenas para o desenvolvimento dessa dissertação, mas principalmente para minha formação profissional.

Ao Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos que assumiu papel de destaque na aquisição dos conhecimentos práticos sobre proteoma.

Ao Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira pelas valiosas sugestões.

Aos Drs. Hugo Molinari (CENARGEN) Celso Jamil (IAPAR), Emanuel Souza (UFPR) e Guilherme Brand por terem contribuído diretamente na realização desse trabalho.

A Kenia, minha namorada, pela ajuda com a dissertação, pela paciência e acima de tudo pelo companheirismo.

À Marília pela importante contribuição com os assuntos relacionados ao mestrado e pela grande amizade. Por ser uma pessoa tão culta, simpática, esforçada e determinada, tornou-se para mim uma referência como profissional e pessoa.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia do IAPAR.

Aos amigos de longa data da “Esquininha do Horror” e aos amigos da República Micróbios pelo apoio e descontração.

A meus pais, Mara, puro amor total e incondicional e
Queiroz, sabedoria e apoio.

A meus irmãos Thiago e Bruno,
Alegria e companheirismo.

Dedicatória...

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Citros	16
2.2 Citricultura.....	17
2.2.1 Aspectos sócio-econômicos.....	17
2.2.2 A ascensão da citricultura paranaense.....	18
2.2.3 Porta-enxertos	19
2.2.3.1 Importância e necessidade de diversificação.....	19
2.2.3.2 Citrumelo ‘Swingle’.....	21
2.3 Déficit Hídrico.....	22
2.3.1 Efeitos do déficit hídrico em citros.....	22
2.3.2 Mecanismos de resposta das plantas ao déficit hídrico.....	24
2.4 Papel da prolina em plantas submetidas a estresses	28
2.5 Proteínas.....	30
2.5.1 Proteômica de plantas.....	31
2.5.2 Proteômica de plantas sob estresses abióticos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Material vegetal e condições de desenvolvimento.....	36

3.2 Experimento de déficit hídrico.....	37
3.3 Quantificação de Prolina.....	38
3.4 Extração de proteínas.....	39
3.5 Quantificação de proteínas.....	40
3.6 Eletroforese bi-dimensional.....	40
3.6.1 Re-hidratação das amostras	41
3.6.2 Focalização isoeletrica (IEF)	41
3.6.3 Equilíbrio das tiras	43
3.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS PAGE.....	43
3.7 Fixação das proteínas e coloração dos géis.....	44
3.8 Captura das imagens dos géis e análise in silico dos spots	45
3.9 Extração de proteínas dos spots.....	45
3.10 Clivagem enzimática.....	46
3.11 Espectrometria de massa.....	47
3.11.1 Cristalização das amostras.....	47
3.11.2 Detecção dos espectros de massa dos peptídeos.....	47
3.11.3 Análise dos espectros e identificação de proteínas.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Parâmetros hídricos no solo e na planta.....	49
4.2 Teores de prolina	50
4.3 Padronização de metodologias de extração e separação de proteínas.....	53
4.4. Análises comparativas das imagens dos géis.....	56
4.5 Análise dos spots por espectrometria de massa	57
4.5.1 Análise dos espectros de massa ms1.....	57
4.5.2 Análise dos espectros ms2.....	62

4.6.1 Análise comparativa de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e submetidas ao déficit hídrico (CE)	65
4.6.1.1 ATP SINTASE SUB-UNIDADE β	67
4.6.1.2 TAXANE 2- α -O-BENZOILTRANSFERASE (TBT).....	67
4.6.1.3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A CLOROFILA a/b.....	69
4.6.1.4 PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO RNA RICA EM GLICINA.....	70
4.6.1.5 ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH).....	71
4.6.1.6 RUBISCO ATIVASE.....	72
4.6.1.7 PROMOTOR DE CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE AUXINA.....	73
4.6.2 Análise comparativa de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' transgênicas irrigadas (TI) e submetidas ao déficit hídrico (TE).....	74
4.6.2.1 ATP SINTASE SUBUNIDADES α E β	76
4.6.2.2 RECEPTOR DE ETILENO.....	76
4.6.2.3 PROTEÍNA DO COMPLEXO DE EVOLUÇÃO DO OXIGÊNIO (OXYGEN INVOLVING COMPLEX PROTEINS - OEC).....	77
4.6.2.4 FOSFOGLICERATO QUINASE.....	78
4.6.3. Análise comparativa de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e transgênicas irrigadas (TI).....	79
4.6.3.1 Géis bidimensionais 4-7.....	79
4.6.3.1.1 PROTEÍNA SIMILAR À LECTINA (LECTIN RELATED PROTEIN).....	82
4.6.3.1.2 HEMOGLOBINA.....	83
4.6.3.2 Géis bi-dimensionais em pH 3-10	84
4.6.3.2.1 PROTEÍNA PUTATIVA SIMILAR À MIRACULINA.....	87
5. CONCLUSÕES.....	88
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7. REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Bi-dimensional
2-D PAGE	Eletroforese bi-dimensional em géis de poliacrilamida
ABA	Ácido abscísico
<i>ABF2</i>	ABA Responsive element (ABRE) binding factor 2
ACN	Acetonitrila
ADH	Álcool desidrogenase
AHCT	Antocianina O-hidroxicinamoil transferase
AMBIC	Bicarbonato de amônia
<i>AREB1</i>	ABA-Responsive element binding protein 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BEAT	Benzilalcool O-acetiltransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Soroalbumina bovina
C	Plantas controle
CAB	Proteínas de ligação às clorofila a /b
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
CC	Capacidade de campo
cDNA	DNA complementar
CDPKs	Proteínas quinase do tipo cálcio-dependente
CE	Plantas controle estressadas
CHAPS	3-[3-cholamidopropil-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CI	Plantas controle irrigadas
CO	Monóxido de carbono
CTV	Vírus da tristeza dos citros
DAT	Deacetilvindoline 4-O-acetil transferase
ddH ₂ O	Água destilada / deionizada
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>DREB2A</i>	Dehydration responsive element (DRE) binding protein
DTT	Ditiotreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por eletronspray
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCBT	Antranilato <i>N</i> -hidroxicinamoil/benzoil transferase
HO ₂ ⁻	Hidroperoxila
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	Imobiline poliacrilamide gradient
LEA	<i>Late Abundant Proteins</i>
LEM	Laboratório de Espectrometria de Massas
LHCII	Light-Harvesting complex of photosystem II
MALDI	Ionização por desorção a laser assistida por matriz
MF	Massa fresca

MM	Massas moleculares
MPa	Megapascal
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massa
MSC	Morte súbita do citros
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Óxido nítrico
O ₂ ·-	Radicais superóxido
OEC	Proteína do complexo de evolução do oxigênio
OH-	Hidroxila
P5CDH	Pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
P5CR	Pirrolina-5-carboxilato redutase
P5CS	Δ1-pirrolina-5-carboxilato sintetase
<i>P5CSF129A</i>	P5CS mutante de <i>Vigna acontifolia</i>
PI	Ponto isoelétrico
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
ProDH	Prolina desidrogenase
PSII	Fotossistema II
PVPP	Poli-vinil-poli-pirrolidona
RFOs	Oligossacarídeos da família rafinose
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>RPK1</i>	Receptor like kinase 1
RuBP	Rubisco ativase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS
SH	Grupamentos sulfidríla
SRK2C	SNF1-related protein kinase 2C
T	Plantas transgênicas
T.E.	Tampão de Equilíbrio
TBT	Alfahidroxitane-2-O-benzoiltransferase
TCA	Ácido tricloroacético
TDR	Reflectometria no domínio do tempo
TE	Plantas transgênicas estressadas
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TI	Plantas transgênicas irrigadas
VHrs	Volt-horas
Ψ _s	Potencial osmótico
Ψ _t	Potencial total de água

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema apresentando algumas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares das plantas submetidas ao déficit hídrico. Fonte: adaptado de SHAO et al., 2008.....	27
Figura 2 - Esquema da via metabólica de biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas. (Adaptado de VERBRUGGEN e HERMANS, 2008).....	29
Figura 3 - Etapa de re-hidratação das amostras nas tiras IPG. A - Tiras manipuladas e colocadas no <i>Reswelling Tray</i> . B - Tiras hidratadas inseridas em <i>manifold</i> para focalização.....	41
Figura 4 - Protocolo utilizado na separação de proteínas referentes aos tecidos foliares de citrumelo "Swingle" em primeira dimensão com tiras IPG de 13 cm em intervalo de pH 4-7. Imagem obtida a partir do software Ettan IPGphor II versão 2.1 (Amershan Biosciences – GE Healthcare).....	42
Figura 5 - Porcentagem de água no substrato em relação à capacidade de campo (%) de vasos de plantas transgênicas contendo o gene <i>P5CSF129A</i> e plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica.....	49
Figura 6 - Teor de prolina livre em folhas de plantas controle não-transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene <i>P5CSF129A</i> em condições normais de suprimento hídrico ($\Psi_t = -1,1$ MPa a $-1,5$ MPa) e sob déficit hídrico ($\Psi_t = -3,0$ MPa a $-3,5$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão (n=3).....	51
Figura 7 – Principais etapas e reagentes utilizados no preparo e separação das amostras de proteínas.....	53
Figura 8 – Exemplo de gel bi-dimensional obtido com amostra de proteínas de folhas do porta-enxerto citrumelo 'Swingle' após padronização de metodologia. Focalização isoelétrica em tira IPG de 13 cm pH 4-7 seguindo protocolo de voltagem explicitado na Figura 3. SDS PAGE em concentração 11% e coloração dos géis com Coomassie Blue G-250. À esquerda estão assinalados os marcadores de peso molecular. Imagem obtida a partir do programa de análise ImageMaster Platinum 6.0.....	56

Figura 9 - Espectro de massa ms1 obtido em MALDI TOF-TOF a partir de amostra protéica de citrumelo “Swingle” digerida com solução enzimática de tripsina.....	58
Figura 10 - Página da web de acesso ao Mascot com a opção PMF. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados nas buscas realizadas com os dados obtidos por MALDI – TOF – TOF.....	59
Figura 11 - Espectro de massa ms2 obtido pela fragmentação do íon 2163 e posterior sequenciamento manual auxiliado pelo programa PepSeq. Os dados abaixo do espectro referem-se à pesquisa por similaridade da sequência obtida mostrando homologia com a enzima tripsina no banco NCBI.....	60
Figura 12 - Site do Mascot mostrando gráfico de probabilidade de identificação de proteína conforme algoritmos Mowse Score. Por este gráfico, os resultados com P maior que 40 indicam peptídeos com homologia significativa e P maior que 42 refere-se à identidade ou extensa homologia ($p < 0,05$).....	61
Figura 13 - Página da web de acesso ao Mascot com a opção MS/MS íon search. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados nas buscas realizadas com os dados obtidos por MALDI – TOF – TOF. O íon fragmentado neste caso é o de m/z 1883.....	62
Figura 14 - Espectro de massas obtido a partir da fragmentação do íon de massa/carga 1328 em MALDI – TOF – TOF com seqüenciamento manual no programa PepSeq. Comparação no banco NCBI apontou alto grau de similaridade com a proteína ATP synthase subunit B de <i>Citrus macroptera</i>	64
Figura 15 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo “Swingle”. A - Controle irrigado (CI). B - Controle estressado (CE). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 4 – 7. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. Seta para cima indica maior expressão e seta para baixo indica menor expressão.....	65
Figura 16 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo “Swingle”. A – Transgênico irrigado (TI). B - Transgenico estressado (TE). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 4 – 7. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. Seta para cima indica maior expressão e seta para baixo indica menor expressão.....	74

Figura 17 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo “Swingle”. A - Controle irrigado (CI). B – Transgênico irrigado (TI). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 4 – 7. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. Seta para cima indica maior expressão e seta para baixo indica menor expressão.....

80

Figura 18 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo “Swingle”. A - Controle irrigado (CI). B – Transgênico irrigado (TI). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 3 – 10. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. As setas indicam a presença dos spots apenas nos géis A.....

85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo adotado para solução de gel em concentração 11% de acrilamida para volume final de 100 mL.	44
Tabela 2 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ controle irrigadas (CI) e submetidas ao déficit hídrico (CE) através de PMF. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot.....	66
Tabela 3 - Identificação de proteína com expressão diferencial devido ao déficit hídrico em plantas de citrumelo “Swingle” (irrigado - CI x estressado - CE). Através de seqüenciamento. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no NCBI.....	66
Tabela 4 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ transgênicas irrigadas (TI) e submetidas ao déficit hídrico (TE) através de PMF. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot.....	75
Tabela 5 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ transgênicas irrigadas (TI) e submetidas ao déficit hídrico (TE) através de sequenciamento. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot.....	75
Tabela 6 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ controle irrigadas (CI) e transgênicas irrigadas (TI) através de PMF (gel 2D pH 4-7). Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot.....	81
Tabela 7 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ controle irrigadas (CI) e transgênicas irrigadas (TI) através de PMF (gel 2D pH 3-10). Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot.....	86

RESUMO

A citricultura é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro e o uso de porta-enxertos está intimamente associado à competitividade dos pomares, pois influencia diversas características agronômicas de interesse da copa. O porta-enxerto citrumeleiro Swingle (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) transformado com o gene mutante *P5CSF129A* de *Vigna acotifolia* que codifica para a enzima Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) proporciona alto acúmulo do aminoácido prolina e mostra-se mais tolerante a situações de déficit hídrico quando comparado com plantas não transformadas. O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas em plantas de citrumeleiro “Swingle” com alto acúmulo de prolina, devido à expressão constitutiva do transgene *P5CSF129A* sob controle do promotor 35S CaMV, tanto em condições de déficit hídrico como em condições normais de suprimento de água. O estado hídrico nas folhas foi monitorado através de psicrômetros e as análises foram feitas em tecidos foliares de plantas transformadas e não transformadas com suprimento hídrico adequado ($\Psi_t = -1,1$ a $-1,5$ MPa) e em situação de estresse ($\Psi_t =$ de $-3,0$ a $-3,5$ MPa). A expressão diferencial de proteínas devido ao alto acúmulo de prolina foi feita comparando-se plantas controles e transgênicas em condições normais de suprimento de água. Já as comparações entre plantas transgênicas irrigadas e estressadas foram realizadas para identificar diferenças de expressão nas plantas com alto acúmulo de prolina devido ao estresse, enquanto comparações entre plantas controle em situação irrigada e estressada visaram identificar proteínas expressas em plantas não-transformadas devido ao estabelecimento de estresse hídrico. Os teores de prolina livre nas amostras foliares em condição irrigada mostraram-se cerca de 2,5 vezes maiores nas plantas transgênicas do que nas plantas controle. Com a imposição do estresse, os níveis de prolina mantiveram-se praticamente constantes nas plantas transgênicas (cerca de $350 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$) e aumentaram em média 40% nas plantas controle ($175 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$). Para análise proteômica, proteínas totais de tecido foliar, extraídas pelo método fenol/SDS, foram separadas por eletroforese bi-dimensional utilizando tiras IPG de 13 cm em pH 4-7 na primeira dimensão para posterior separação por SDS PAGE. As imagens dos géis foram analisadas com programa ImageMaster Platinum 6.0 para identificação dos spots diferenciais devido ao acúmulo de prolina ou estresse hídrico. Estes spots foram digeridos com tripsina e os peptídeos analisados com espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF possibilitando a identificação de 17 proteínas por Peptide Mass Fingerprinting (PMF), sequenciamento *de novo* e MS/MS íon search. As buscas foram feitas no programa Mascot para análises de PMF e MS/MS íon search, ou a partir de comparações das seqüências geradas pelo sequenciamento *de novo* com dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). As comparações entre as plantas controle nas duas situações hídricas (irrigado e estressado) possibilitaram a identificação das proteínas ATP sintase subunidade β , taxano 2-alfa-O-benzoiltransferase, proteína de ligação a clorofila a/b, proteína de ligação ao RNA rica em glicina, álcool desidrogenase, promotor de crescimento independente de auxina e rubisco ativase. Quando comparadas as plantas transgênicas irrigadas e estressadas, identificaram-se as proteínas ATP sintase subunidades β e α , fosfoglicerato quinase, receptor de etileno e complexo de evolução do oxigênio (OEC). Já ao se

contrastar plantas controle e transgênicas em condições normais de suprimento hídrico foram identificadas as proteínas lectina, hemoglobina e miraculina.

Palavras-chave: porta-enxerto, proteoma, estresse hídrico, p5cs.

ABSTRACT

Citriculture is one of the most important agribusiness activities in Brazil and the use of rootstocks is closely associated with citrus orchard competitiveness by affecting various important agronomic characteristics. Citrumelo Swingle plants (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) expressing the mutant gene *P5CSF129A* of *Vigna acontifolia*, that codes for the enzyme Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), accumulate high free proline. These plants have been shown to present greater tolerance to water deficit when compared to non transformed plants. The objective of this work was to identify differentially expressed proteins in leaves of citrumelo Swingle transgenic plants with high proline accumulation, due to the constitutive expression of the transgene *P5CSF129A* under control of the 35S CaMV promoter, under normal water supply conditions and when subjected to water deficit. Leaf water status was monitored through psychrometers and proteomic analysis were carried out using leaf tissues of transgenic and control plants with normal water supply ($\Psi_t = -1,1$ to $-1,5$ MPa) and under stress situation ($\Psi_t =$ de $-3,0$ to $-3,5$ MPa). The differential protein expression caused by high proline accumulation was performed comparing control and transgenic plants in irrigated condition. Comparisons of irrigated with stressed transgenic plants were done to identify differentially expressed proteins in plants with high proline accumulation when submitted to water deficit, while comparisons between non transformed plants under irrigated and stressed conditions were carried out to identify proteins expressed in citrumelo Swingle due to the establishment of water stress. The levels of free proline in leaf samples in normal water supply conditions were about 2.5 times higher in transgenic plants than in non transformed control plants. With the stress imposition, proline levels remained almost invariable in transgenic plants (about $350 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$) and increased 40% in control plants ($175 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$). For proteomic analysis, total leaf proteins were extracted by phenol/SDS method and separated by bi-dimensional electrophoresis using IPG strips of 13 cm with pH gradient immobilized at 4-7 in the first dimension for further separation by SDS PAGE. The 2D-gel images were analyzed through ImageMaster Platinum 6.0 program to identify differential spots due to proline accumulation or water stress. These spots were digested with trypsin and the peptides analysis with mass spectrometer MALDI-TOF-TOF enabled the identification of 17 proteins by Peptide Mass Fingerprinting (PMF), *de novo* sequencing and MS/MS ion search. The searches were made in Mascot for PMF e MS/MS ion search analysis or by direct comparison of the sequences generated by *de novo* sequencing with the data in NCBI database (National Center for Biotechnology Information). Comparisons between control plants in both water supply situations (irrigated and drought) identified the following proteins: subunit β ATP synthase, taxane 2-alpha-O-benzoil transferase, chlorophyll a/b binding protein, RNA binding protein glycine rich, alcohol dehydrogenase, growth promoter auxin-independent and rubisco activase. When irrigated and drought stressed transgenic plants were compared, we identified the proteins α / β subunit ATP synthase, phosphoglycerate kinase, ethylene receptor and oxygen- evolving complex protein. Finally, comparisons between control and transgenic plants overproducing proline under normal water supply conditions showed modification of the expression of lectin, hemoglobin and miraculin.

Key words: citrumelo Swingle, proline, water deficit, proteome.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro e gera milhares de empregos diretos e indiretos em diversos setores como serviços, transportes e comércio (NEVES e JANK, 2006). As condições ideais de solo e clima contribuem para a liderança na produção mundial e, impulsionado pelo grande parque industrial paulista (maior do mundo), o Brasil também assume a dianteira na produção e exportação do principal subproduto cítrico, o suco de laranja concentrado congelado (SLCC) (ABECITRUS, 2007).

A competitividade de um pomar citrícola encontra-se intimamente ligada ao uso de porta-enxertos e estes influenciam diretamente diversas características importantes durante o desenvolvimento das plantas e dos frutos, tanto em aspectos hortícolas como fitopatológicos (SCHAFER, 2001). Devido às características agrônomicas superiores que propicia, principalmente tolerância a condições de seca, o limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) é o porta-enxerto de maior utilização. A vulnerabilidade do parque citrícola brasileiro, todavia, é muito grande devido a este predomínio na sustentação dos pomares, tornando urgente um programa de diversificação de porta-enxertos. Essa condição de risco é ainda mais crítica em razão do surgimento de diversas doenças, recentemente agravada pela ocorrência, no norte do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro, da morte súbita dos citros (MSC) em limoeiro 'Cravo'.

A evidente necessidade de diversificação de porta-enxertos na citricultura levou à realização de diversos estudos visando ressaltar as características agrônomicas individuais de porta-enxertos alternativos. Trabalhos envolvendo citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) evidenciaram características satisfatórias para o seu uso na citricultura, principalmente porque este porta-enxerto propicia um bom desenvolvimento das espécies de copa e confere resistência às principais doenças que acometem a produção cítrica, entre elas o declínio e a MSC (POMPEU JÚNIOR, 2005). Entretanto, ao contrário do limão-cravo, este porta-

enxerto (citrumelo Swingle) mostra-se pouco tolerante a situações de estresses ambientais, como o déficit hídrico (POMPEU JUNIOR, 1991)

A ocorrência de deficiência hídrica é frequente em algumas regiões brasileiras e dentre os estresses abióticos é considerado o principal fator adverso para produção agrícola. Com efeitos negativos em diversos processos biológicos, o déficit prejudica o crescimento das plantas e é responsável por uma queda na produtividade de até 70% em diferentes espécies (WURGLER-MURPHY e SAITO, 1997; ORTOLANI e CAMARGO, 1987). Enquanto algumas plantas são mais tolerantes a situações de déficit e possuem maior capacidade de resposta, outras são incapazes de produzir determinadas proteínas ou metabólitos necessários nas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares, tornando-se menos tolerantes ou sensíveis ao estresse (CATTIVELLI et al., 2008). Neste aspecto, a engenharia genética, utilizando alguns genes que codificam componentes de vias metabólicas relacionadas a estresse, é uma estratégia para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes a situações de déficit hídrico.

Com base em estudos que demonstram a característica osmoreguladora e osmoprotetora do aminoácido prolina em plantas submetidas a estresses ambientais (HSU et al., 2003; KAVI KISHORE et al., 2005), Molinari et al. (2004) desenvolveram estudos em eventos transgênicos do porta-enxerto citrumelo 'Swingle' superexpressando o gene mutante *P5CSF129A* de *Vigna acontifolia* que está envolvido diretamente no primeiro passo da síntese do aminoácido prolina a partir de glutamato. Estes eventos apresentaram alto acúmulo de prolina livre em folhas e, como consequência, maior tolerância a situações de déficit hídrico. O acúmulo de prolina tem sido observado durante estresses ambientais e nessas situações pode atuar, entre outras funções, como mediador do ajustamento osmótico, estabilizador de proteínas (VAN RENSBURG et al., 1993) e removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SMIRNOFF; CUMBES, 1989).

Considerando que os mecanismos de tolerância a situações de déficit hídrico estão intimamente ligados a processos metabólicos regulados por enzimas e/ou por interação entre outras proteínas celulares, os estudos com

proteínas podem ser bastante pertinentes na aquisição de informações acerca dos processos biológicos que regulam os mecanismos de tolerância.

Dessa forma, este trabalho teve por finalidade identificar proteínas diferencialmente expressas em plantas de citrumelo 'Swingle' transgênicas superexpressando o gene *P5CSF129A* visando a identificação daquelas relacionadas não somente ao alto acúmulo de prolina *per se* em condições normais de suprimento de água como também devido à imposição de estresse hídrico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citros

As espécies de plantas denominadas de forma geral como citros são pertencentes não apenas ao gênero *Citrus*, mas também aos gêneros *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*, bem como aos híbridos formados entre os indivíduos da família Rutaceae, a qual engloba os gêneros acima destacados (CHAPOT, 1975; SWINGLE, 1967).

Embora haja controvérsias quanto à exatidão da região de origem, alguns historiadores sustentam que as espécies de citros teriam surgido no sudeste asiático em regiões que hoje incluem a Índia, China, Butão, Birmânia e Malásia (ABECITRUS, 2008) e, segundo Spurling (1969), a exploração das frutas teve início há mais de 4.000 anos no sul da China e dali dispersou-se em direção ao sudeste pelas Filipinas e outras numerosas ilhas do Pacífico. No Brasil, os relatos mais antigos do cultivo de citros são datados de 1540 na ilha de Cananéia, no estado de São Paulo e, posteriormente, em 1549, em Salvador (BA) com a chegada dos padres jesuítas (WEBBER et al., 1967; CHAPOT, 1975; CAMPOS, 1976). Atualmente, as plantas cítricas são cultivadas em uma ampla faixa ao redor do mundo, embora as principais áreas produtoras concentrem-se em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20° N ou 20° S (AGUSTÍ, 2000).

As plantas cítricas de maior interesse comercial são formadas por um amplo grupo de espécies e híbridos principalmente dos gêneros *Poncirus*, *Citrus* e *Fortunella*, sendo as espécies do gênero *Citrus* as de maior relevância econômica. Como exemplos comerciais mais representativos podem ser destacados: as laranjas (*Citrus sinensis*), as tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), os limões (*Citrus limon*), as limas ácidas como Tahiti (*Citrus latifolia*) e galego (*Citrus aurantifolia*) e doces como a lima da pérsia (*Citrus limettioides*), o pomelo (*Citrus paradisi*), a cidra (*Citrus medica*), a laranja azeda (*Citrus aurantium*) e as toranjas (*Citrus grandis*) (IAC, 2006).

O gênero *Citrus* é representado por plantas de médio porte (arbóreo-arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos tipo baga, contendo vesículas

preenchidas com suco de grande interesse comercial. A grande complexidade filogenética e taxonômica observada no gênero *Citrus* torna difícil uma classificação precisa dos indivíduos e inúmeros são os tratamentos sistemáticos sugeridos (ENGLER, 1931; SWINGLE, 1967; TANAKA, 1961). Pesquisas com isoenzimas mostraram que todos os frutos comercialmente comestíveis surgiram a partir de apenas três espécies: *C. grandis* Osbeck (toranjas), *C. medica* L. (cidras) e *C. reticulata* Blanco (tangerinas) (MABBERLEY, 1997).

Os citros tem, em geral, longo período juvenil, que depende da espécie, do cultivar e das condições ambientais de crescimento, variando normalmente de 5 a 13 anos (DAVIES e ALBRIGO, 1994; SPIEGEL-ROY e GOLDSCHMIDT, 1996). Durante esse período desenvolvem estruturas morfológicas características, como folhas grandes e com espinhos e, principalmente, são incapazes de reprodução sexuada, ou seja, não formam flores (LEOPOLD e KRIEDEMANN, 1975; TAIZ e ZIEGER, 1998)

2.2 Citricultura

2.2.1 Aspectos sócio-econômicos

A laranja é uma das principais frutas cultivadas no mundo, sendo consumida in natura, como fruta de mesa, e na forma de sucos concentrados, pasteurizados ou frescos. No processo de obtenção do suco da laranja, vários outros subprodutos com aplicação comercial são obtidos, como d'limonene, terpenos, líquidos aromáticos e farelo de polpa cítrica. Estes subprodutos estão principalmente relacionados com a fabricação de produtos químicos, solventes, aromas, fragrâncias, substâncias para aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, complemento para ração animal, entre outros. Este uso comercial diversificado expande ainda mais o número de pessoas influenciadas direta e indiretamente pelo agronegócio (HASSE, 1987; KOLLER, 1994; TOCCHINI et al., 1995; GONÇALVEZ, 2001;)

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para o país. A área plantada está ao redor de um milhão de hectares e a produção cítrica, que se dá em cerca de 270 milhões de plantas, supera 19 milhões de toneladas, a maior do mundo nos últimos anos (NEVES e JANK, 2006;). A safra 2008/2009 da produção de laranjas foi cerca de 310 milhões de caixas de 40,8 kg, que foi 15 % abaixo do potencial produtivo (360 milhões de caixas) devido a ocorrência de estiagens (CEPEA, 2009).

O Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhões de dólares anuais. O setor citrícola brasileiro, somente no Estado de São Paulo, gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos (EMBRAPA, 2006).

No Brasil, a produção de citros ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde se encontram cerca de 85% da produção brasileira de laranjas (14,8 milhões t; 700 mil ha); também, na ordem de aproximadamente 1,5 milhão t, destaca-se a produção de lima ácida Tahiti e tangerinas, como a Ponkan e o tangor Murcott. Outros estados como Sergipe, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina contribuem para o agronegócio dos citros com a produção, principalmente, de laranjas, tangerinas e lima ácida Tahiti (ABECITRUS, 2008).

2.2.2 A ascensão da citricultura paranaense

A citricultura paranaense ainda está em expansão e, em 2007, sua produção atingiu 502.979 toneladas, gerando Valor Bruto da Produção de R\$ 149,9 milhões naquele ano. Esse resultado representou crescimento de 23,54%, em relação à renda gerada pelo setor em 2006, que foi de R\$ 121,3 milhões (IBGE, 2008)

O clima e a qualidade do solo são dois ingredientes importantes e que ajudam bastante no potencial de rentabilidade, visto que as condições são altamente favoráveis à citricultura. A qualidade do solo, mais fértil em comparação com os solos onde a citricultura paulista está instalada, por exemplo, possibilita reduzir custos com fertilizantes em relação aos produtores de São Paulo. Além disso, o Paraná possui menor incidência de problemas fitossanitários graves, por serem áreas novas e isoladas e tudo isso representa menor custo de produção e maior potencial produtivo. Os municípios que mais se destacam na produção de citros concentram-se na região Noroeste do Estado, como Paranavaí, Alto Paraná, Rolândia e Nova Esperança (DIARIO DO NOROESTE, 2008).

2.2.3 Porta-enxertos

2.2.3.1 Importância e necessidade de diversificação

O emprego de porta-enxertos na citricultura permite criar uma associação que beneficia mutuamente as duas plantas que se associam, ou seja, o porta-enxerto e a planta enxertada (copa). A nova planta formada sofre, portanto, influência dos dois indivíduos associados e a compatibilidade entre estes pode interferir na qualidade e produtividade final de um pomar (POMPEU JUNIOR, 2005).

A utilização de porta-enxertos tem sido feita visando melhorar principalmente o desenvolvimento das espécies de copa e dentre as características influenciadas podem ser destacadas aquelas ligadas ao crescimento, tamanho, precocidade de produção, produtividade, época de maturação e peso dos frutos, coloração da casca e dos frutos, teor de açúcares e de ácidos, permanência dos frutos na planta, conservação após a colheita, transpiração das folhas, fertilidade do pólen, composição química das folhas, capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, tolerância a salinidade, tolerância à seca e ao frio, resistência e tolerância a moléstias e pragas e resposta a produtos de abscisão (POMPEU JÚNIOR, 1991). O uso de porta-enxertos, por afetar mais de 20 características agronômicas da cultivar copa

e dos frutos, é considerado essencial na citricultura e está intimamente associado com a produtividade dos pomares (SCHÄFER et al., 2001).

Diversos estudos mostram que existem diferenças significativas na produção de plantas cítricas quando são testadas sob diferentes porta-enxertos. Ledo et al. (1999), ao avaliarem o comportamento de diferentes cultivares de laranjeiras doces sobre os porta-enxertos limão 'Cravo', tangerinas 'Cleópatra' e 'Sunki' e citrange 'Carrizo', observaram que, em relação aos demais porta-enxertos, o limão 'Cravo' mostrou tendências de induzir maior produção/volume de copa, maior peso médio do fruto, menor teor de sólidos solúveis totais e de acidez total. O limão 'Cravo' tem sido amplamente utilizado como porta-enxerto nas principais áreas produtoras do país pelas características agrônômicas superiores que propicia aos indivíduos de copa, tais como precocidade na formação das mudas, compatibilidade com praticamente todas as variedades comerciais de copa, alta produção, tolerância à seca e resistência ao vírus causador da tristeza. No entanto, apresenta alta suscetibilidade ao "declínio dos citros", doença que tem causado a eliminação de milhões de plantas cítricas por ano no Brasil (POMPEU JUNIOR, 2005) e, segundo dados do fundo de defesa do citricultor (FUNDECITRUS, 2006), uma doença de combinação copa/ porta-enxerto, denominada Morte Súbita do Citrus (MSC), representa uma ameaça à indústria citrícola nacional, pois afeta todas as variedades comerciais de laranja doce e tangerinas Cravo e Ponkan enxertadas sobre limão Cravo.

O perfil da citricultura brasileira, por apresentar um quadro em que as principais espécies de copa encontram-se enxertadas sobre um número reduzido de porta-enxertos, é vulnerável a novas enfermidades que periodicamente acometem as produções. Os pomares do centro do País estão enxertados, principalmente, sobre limoeiro-cravo, enquanto no Rio Grande do Sul, aproximadamente 90% da citricultura está enxertada sobre o *Poncirus trifoliata* (SCHÄFER e DORNELLES, 2000). O predomínio de um único porta-enxerto é preocupante, à medida que torna o parque citrícola vulnerável a problema semelhante ao que ocorreu na década de 40, quando o vírus da tristeza dos citros (CTV) dizimou a maioria dos pomares cítricos, enxertado sobre um único porta-enxerto, a laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) (POMPEU JUNIOR, 2005).

É evidente a necessidade de diversificação de porta-enxertos na citricultura, portanto diversos estudos tem sido realizados para avaliar o comportamento e as características agrônômicas individuais de porta-enxertos (SCHÄFER, 2001; FOCESATO, 2005).

2.2.3.2 Citrumelo 'Swingle'

O citrumelo 'Swingle' é um híbrido obtido na Flórida a partir do cruzamento de pomelo 'Duncan' (*Citrus paradisi*) com trifoliata (*Poncirus trifoliata*). O objetivo inicial era transferir a resistência a geadas dos trifoliatas para os pomelos, muito suscetíveis ao frio na Florida. Sua fruta não apresenta qualquer qualidade para consumo e nos anos 40 começou a ser testado como porta-enxerto para variedades comerciais de citros. Despontou em diversos experimentos em praticamente todas as regiões citrícolas mundiais como um ótimo porta-enxerto alternativo ao uso de trifoliata e seus híbridos citranges "Carrizo" e "Troyer", muito comuns fora do Brasil. Recebeu o nome de Swingle, em homenagem ao seu criador, W. T. Swingle (CITROLIMA, 2008).

O citrumeleiro é considerado tolerante à gomose (*Phytophthora* sp.), ao nematóide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*), à tristeza dos citros, ao declínio, à exocorte, à xiloporose e a baixas temperaturas. A qualidade dos frutos de laranjeiras enxertadas em citrumelo 'Swingle' é considerada ótima, com elevada concentração de sólidos solúveis e alto rendimento industrial na extração de suco (POMPEU JÚNIOR, 1991).

Nos últimos anos, tem ocorrido um grande interesse pelo citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf x *P. trifoliata* Raf) para produção de mudas cítricas no Estado de São Paulo, com aumento de 20% no número de mudas produzidas sobre este porta-enxerto no período de 1999 e 2003 (POMPEU JÚNIOR et al., 2004). Comportamento semelhante foi observado no Estado da Flórida-EUA, entre os anos de 1983 e 1993, tendo esta variedade um crescimento de 15% para 51%, considerando todas as outras variedades utilizadas (WILLIAMSON e MAUST, 1996). Outra importante vantagem associada a esse porta-enxerto é sua

resistência à morte súbita dos citros (MSC), doença de causa ainda não determinada (BARBASSO, 2005; GIMENES-FERNANDES et al., 2001; POMPEU JÚNIOR, 1999). Entretanto, mesmo sendo tolerante a doenças como a morte súbita dos citros (MSC), os porta-enxertos alternativos ao limoeiro cravo, como o citrumelo 'Swingle', apresentam uma importante desvantagem: são mais suscetíveis ao estresse hídrico (STUCHI et al., 2004).

2.3 Déficit Hídrico

2.3.1 Efeitos do déficit hídrico em citros

Estresse pode ser definido como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, induzindo mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais, em princípio, podem ser reversíveis, mas podem tornar-se permanentes conforme o tempo de exposição à situação estressante (LARCHER, 2000).

Embora a citricultura nacional assuma posição de destaque no cenário mundial, deve-se considerar a grande diversificação agroclimática do País e suas condições particulares de cultivo que compreende uma multiplicidade de ambientes, nos quais se verifica desde a ocorrência de geadas ocasionais ou freqüentes até estresses hídricos ou térmicos, implicando múltiplas floradas com crescimento e maturação irregulares dos frutos (CERQUEIRA et al., 2004).

O déficit hídrico pode ser definido como uma situação em que o potencial de água (Ψ_t) e o turgor são reduzidos o suficiente para interferir nas funções normais da célula e ocorre com precipitação abaixo do normal, limitando a produtividade das plantas em meio natural ou em sistema agrícola (KRAMER e BOYER, 1995).

O déficit hídrico tem efeito em diversos processos fisiológicos das plantas e, inicialmente, aumenta a resistência difusiva ao vapor de água, mediante o fechamento dos estômatos, reduzindo a transpiração e,

conseqüentemente, o suprimento de CO₂ para a fotossíntese (NOGUEIRA, 1997; CHARTZOULAKIS et al., 1999; MEDINA et al., 1999). Com a perpetuação do estresse podem ocorrer limitações em outros componentes não estomáticos, como por exemplo, danos nos centros de reação do fotossistema II, os quais podem apresentar reversão parcial com posterior reidratação (ANGELOPOULOS et al., 1996).

A deficiência hídrica severa desencadeia uma maior produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂⁻), hidroxila (OH⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, em desbalanço com os sistemas antioxidantes de defesa, levam a planta a um estado de estresse oxidativo. Estas EROs excessivas podem oxidar diversas biomoléculas e afetar seriamente o metabolismo das plantas, resultando em alterações celulares como danos em membranas, perda de funções das organelas, redução na eficiência metabólica e na fixação do carbono, perda de eletrólitos, disfunções fisiológicas e necrose tecidual, podendo levar à morte da planta (SMIRNOFF, 1993; FOYER, 1994; LAWLOR, 1995; BIANCHI e ANTUNES, 1999; GIROTTI, 2001; SCANDALIOS, 2005; HALLIWELL, 2006).

Os citros são considerados culturas menos tolerantes ou sensíveis ao déficit hídrico e as implicações deste estresse vão depender da fase fenológica em que se encontram as plantas. Os períodos de início de floração e frutificação constituem as fases mais cruciais, pois mesmo necessitando de um período de baixa precipitação para concentração da florada, a perpetuação da deficiência hídrica pode prejudicar o desenvolvimento dos frutos e diminuir a produtividade dos pomares (DOOREMBOS e KASSAM, 1994; MACHADO et al., 2007).

Diferenças genotípicas entre os porta-enxertos podem afetar as relações hídricas em toda a planta, interferindo na distribuição de raízes, na eficiência da captação de água e nutrientes (CASTLE e KRESNORN, 1977), no transporte de substâncias pela anatomia dos elementos de vaso do tronco do porta-enxerto (VASCONCELIOS e CASTLE, 1994) e por outras diferenças associadas à condutividade hidráulica nas raízes (SINCLAIR e ALLEN, 1982). Estas características dos porta-enxertos podem comprometer o suprimento de

água e nutrientes das plantas, influenciando o vigor das cultivares copa e sua tolerância ao estresse hídrico (MEDINA e MACHADO, 1998; SYVERTSEN e LLOYD, 1994).

Segundo Ortolani et al. (1991), é importante o uso de combinações copa/porta-enxerto que apresentem tolerância à seca, dentre outras características agronômicas, pois algumas regiões brasileiras sofrem períodos de déficit hídrico temporário que prejudicam consideravelmente a produção de citros, devido ao cultivo ocorrer predominantemente sem irrigação. De acordo com Ortolani e Camargo (1987), sem considerar os efeitos extremos, o déficit hídrico é responsável por 60 a 70% da variabilidade final da produção em citros. Em estudos com a lima ácida 'Tahiti', Souza et al. (2004) constataram que o déficit hídrico reduziu a produção de frutos das árvores durante o período de sua aplicação, e aumentou a produção nos meses subseqüentes ao estresse.

2.3.2 Mecanismos de resposta das plantas ao déficit hídrico

Estresses ambientais desencadeiam uma grande variedade de respostas nas plantas, desde alterações na expressão gênica e no metabolismo celular até mudanças na taxa de crescimento e produtividade. As respostas são desencadeadas numa tentativa da planta de contornar os efeitos potencialmente prejudiciais causados por ambos os tipos de estresse biótico ou abiótico, incluindo luminosidade, seca, salinidade e altas temperaturas. Dentre os estresses ambientais, o déficit hídrico constitui um dos principais fatores adversos no crescimento e produtividade da planta e o conhecimento das respostas moleculares e bioquímicas é fundamental para o entendimento dos mecanismos de defesa das plantas superiores submetidas à condição de deficiência de água (REDDY et al., 2004; SHAO et al., 2005; SHAO e CHU, 2005; JALEEL et al., 2006; SHAO et al., 2008a).

Plantas cultivadas em locais com adequado suprimento hídrico são, geralmente, menos tolerantes à situação de déficit hídrico e, quando da ocorrência rápida do déficit, os mecanismos morfofisiológicos são severamente

afetados, pois a planta necessita adaptar-se rapidamente a esta situação de déficit. Entretanto, quando o déficit hídrico ocorre gradualmente e/ou no início do ciclo, mais facilmente ocorre a adaptação das plantas (SANTOS e CARLESSO, 1998). Observa-se também que as numerosas respostas fisiológicas da planta sob déficit hídrico podem variar geralmente conforme a severidade e duração do estresse que ficam sujeitas (AGUERA et al., 1998; FOYER, 2001; SHAO et al., 2007; SHAO et al., 2008b), além de também variarem conforme a espécie e estágio de desenvolvimento (JALEEL et al., 2007; JAYAKUMAR et al., 2007)

O estresse osmótico constitui um grande problema na agricultura e ocorre não somente durante a seca, mas também sob condições salinas e de frio, onde se constata diminuição da pressão de turgor em nível celular. A mudança no potencial osmótico (Ψ_s), causada pela diminuição da pressão de turgor, pode ser o principal iniciador da resposta ao estresse hídrico em nível molecular (WURGLER-MURPHY e SAITO, 1997). Mudanças sutis na bioquímica celular, como acúmulo de solutos compatíveis e de proteínas específicas que ocorrem rapidamente após o estresse osmótico parecem estar relacionadas com os mecanismos de tolerância (SHAO et al., 2006).

Características fenotípicas constitutivas (por exemplo, espessura de raiz) estão presentes mesmo na ausência de estresse. Por outro lado, características adaptativas como ajustamento osmótico e tolerância a desidratação surgem em resposta ao déficit hídrico (HEUER, 2003). Redução da atividade fotossintética, acúmulo de ácidos orgânicos e osmólitos, e mudanças no metabolismo de carboidratos constituem respostas fisiológicas e bioquímicas típicas ao estresse.

O estresse hídrico desencadeia a produção de ácido abscísico (ABA), que, por sua vez, está envolvido no fechamento estomático e indução da expressão de genes relacionados ao estresse hídrico (SEKI et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006). Centenas de genes que respondem ao estresse hídrico já foram identificados, sendo que análises moleculares demonstram que estes podem ser do tipo ABA-dependentes e ABA-

independentes para o controle da regulação transcricional de plantas sujeitas ao déficit hídrico (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005).

Várias moléculas-chave sinalizadoras que estão envolvidas com transdução de sinais em resposta ao déficit hídrico já foram identificadas e precisamente analisadas em *Arabidopsis*. Entre elas incluem-se os fatores de transcrição *AREB1* (*ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1*) *ABF2* (*ABA RESPONSIVE ELEMENT (ABRE)-BINDING FACTOR 2*) e *DREB2A* (*DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT (DRE)-BINDING PROTEIN*) (FUJITA et al., 2005; FURIHATA et al., 2006; SAKUMA et al., 2006).

Proteínas do tipo quinase, que estão envolvidas com mecanismos de fosforilação em diversas vias metabólicas, também foram identificadas com relação ao déficit hídrico, como as *RPK1* (*RECEPTOR-LIKE KINASE 1*), *SRK2C* (*SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2C*) e outras proteínas quinase do tipo cálcio-dependente expressas em células-guarda (CDPKs) (UMEZAWA et al., 2004; OSAKABE et al., 2005; MORI et al., 2006;).

Algumas proteínas parecem atuar diretamente na tolerância a estresses abióticos, como chaperonas, proteínas LEA (*Late Abundant Proteins*), osmotinas, proteínas anticongelamento e de ligação a mRNA, enzimas detoxificadoras, proteases e enzimas para biossíntese de osmólitos, aquaporinas, transportadores iônicos, de açúcares e de aminoácidos (BRAY et al., 2000).

Estudos fisiológicos demonstram que açúcares (como os oligossacarídeos da família rafinose – RFOs, sucrose, trealose e sorbitol), alcoóis de açúcar ou polióis (como o manitol), aminoácidos (como a prolina) e aminas (como glicina betaína e poliaminas) são acumulados em diferentes espécies de plantas como resposta ao déficit hídrico (TAJI et al., 2002; BARTELS e SUNKAR, 2005). As mudanças nestes metabólitos em nível celular estão associadas com proteção de funções celulares ou manutenção de estruturas e componentes da célula (SEKI et al., 2007).

No entanto, muitas plantas não possuem a capacidade de sintetizar alguns metabólitos que são naturalmente acumulados em plantas tolerantes a

estresses. A engenharia genética, utilizando alguns genes que codificam componentes de vias metabólicas relacionadas a estresse, é uma estratégia em potencial para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes a situações de déficit hídrico. Algumas plantas transgênicas que possuem genes relacionados a estresse demonstraram maior tolerância a situações de seca (MOLINARI et al., 2004; UMEZAWA et al., 2006).

Alguns dos mecanismos de respostas das plantas submetidas ao déficit hídrico, e que incluem respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares podem ser observados na Figura 1.

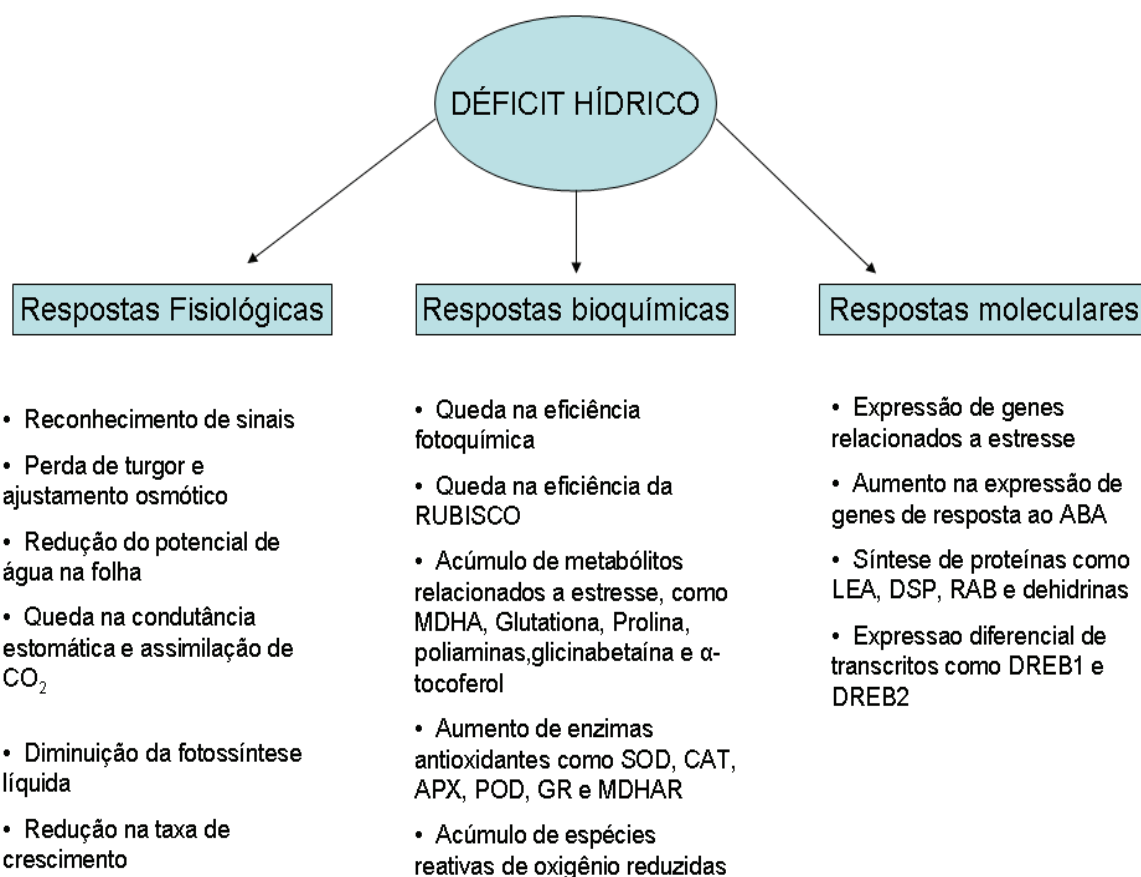


Figura 1 - Esquema apresentando algumas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares das plantas submetidas ao déficit hídrico. Fonte: adaptado de SHAO et al., 2008.

2.4 Papel da prolina em plantas submetidas a estresses

Uma das respostas mais comuns das plantas em situação de estresse é a produção de diferentes tipos de solutos orgânicos compatíveis, que são moléculas de baixo peso molecular, com alta solubilidade e que geralmente não são tóxicos na célula em altas concentrações, como, por exemplo, o aminoácido prolina (SERRAJ e SINCLAIR, 2002).

O acúmulo de prolina foi descrito para várias espécies de plantas em condições de estresses ambientais e, além de atuar como osmólito compatível no ajustamento osmótico, a prolina também contribui com a estabilização de estruturas sub-celulares (como membranas e proteínas), auxilia na proteção da integridade celular, pode funcionar com agente tamponante do pH citosólico, promove equilíbrio redox da célula, atua como agente removedor de espécies reativas de oxigênio (EROs), participa de eventos de sinalização molecular para o estresse, além de servir como estoque de nitrogênio e carbono após período de estresse (STEWART e LEE, 1974; SHEVYAKOVA, 1984; RAINS, 1989; TAYLOR et al., 1996; HARE e CRESS, 1997; ALI et al., 1999; OZTURK e DEMIR, 2002; MAGGIO et al., 2002; HSU et al., 2003; ASHRAF, 2004; KAVI KISHORE et al., 2005).

Embora a síntese de prolina possa ocorrer por duas diferentes vias, tendo como precursores a ornitina e o ácido glutâmico (glutamato), observa-se que geralmente a biossíntese em situação de estresse osmótico acontece principalmente a partir do glutamato. O passo inicial para a biossíntese da prolina via glutamato é a conversão do ácido glutâmico (glutamato) em semialdeído- γ -glutâmico pela ação da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS). Esta ação é seguida de ciclização espontânea para a formação de pirrolina-5-carboxilato (P5C) e então a redução em prolina pela pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR). Para o catabolismo da prolina ocorre a reação de oxidação deste aminoácido pela prolina desidrogenase (ProDH) e, por último, a reação a partir de semialdeído- γ -glutamato em ácido glutâmico é catalisada pela pirrolina-5-carboxilato desidrogenase ou semialdeído- γ -glutamato desidrogenase (P5CDH) (DELAUNEY e VERMA, 1993; DELAUNEY et al., 1993; KAVI KISHOR et al., 1995; KEGG,

2006). Esquema simplificado das vias de biossíntese e de catabolismo da prolina via glutamato podem ser observadas na Figura 2.

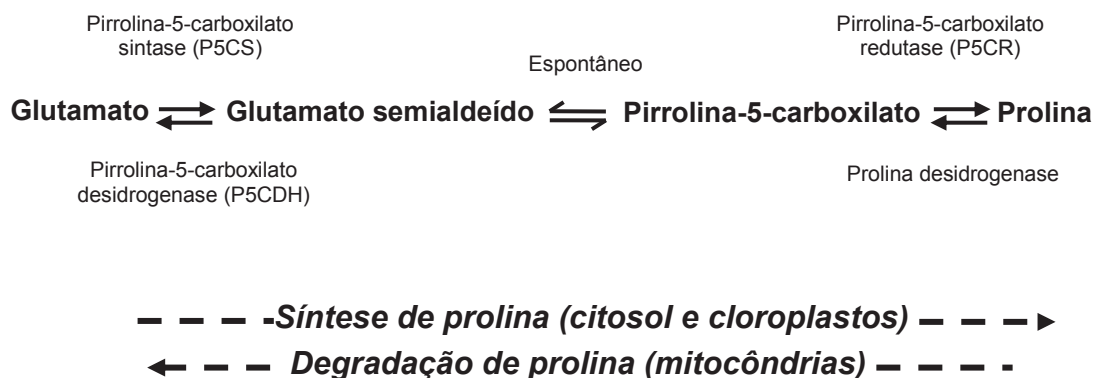


Figura 2 - Esquema da via metabólica de biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas. (Adaptado de VERBRUGGEN e HERMANS, 2008).

O papel da prolina na proteção contra o déficit hídrico e o estresse osmótico pode ser averiguado pela manipulação genética de sua síntese e degradação. O acúmulo de prolina foi também observado em folhas de arroz submetidas a estresse salino e em folhas de milho sob déficit hídrico e estas responderam á recuperação do estresse apresentando redução nas quantidades do aminoácido livre medido (FERREIRA et al., 2002; LIMA et al., 2004).

A superexpressão do gene que codifica a enzima $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), enzima limitante na biossíntese de prolina via glutamato, favoreceu o aumento da biomassa de raízes e o desenvolvimento de flores em tabaco submetido a condição de déficit hídrico (KAVI KISHOR et al., 1995).

Em estudos com os porta-enxertos citrange 'Carrizo' superexpressando o gene *P5CS* constitutivamente, Molinari et al. (2004) observaram que em condições normais a taxa fotossintética de ambas as plantas transgênicas e não-transgênicas foi equivalente, ao passo que após 15 dias de déficit hídrico, as plantas transformadas apresentaram ajustamento osmótico e taxas fotossintéticas superiores às plantas controle. Certamente a presença do transgene e o conseqüente acúmulo de prolina influenciam mecanismos de defesa da plantas e uma análise comparativa das proteínas diferencialmente

expressas pode revelar importantes dados acerca de proteínas envolvidas nas vias metabólicas de defesa contra estresses abióticos.

2.5 Proteínas

O crescimento, desenvolvimento, reprodução, senescência e respostas às influências internas e externas das plantas são processos altamente dinâmicos e caracterizados por um constante fluxo de metabólitos e sinais. Todos estes processos são geralmente mediados e controlados por proteínas que fazem parte de complexas redes funcionais. A fim de compreender os mecanismos moleculares relacionados aos processos celulares e, em um nível organizacional maior, as respostas do organismo a estímulos, é essencial o estudo das proteínas, identificando-as e conhecendo suas funções específicas (OELJEKLAUS et al., 2009).

Proteínas são macromoléculas muito ricas em informação biológica e suas atividades específicas, estados de modificação, associações com outras biomoléculas e seus níveis de expressão são importantes para a descrição de sistemas biológicos (AEBERSOLD, 2003). O perfil de expressão protéica de uma célula se altera inúmeras vezes e pode ser afetado por vários estímulos intra e extra extracelular, como temperatura, estresse, sinais apoptóticos, contato com patógenos, entre outros (BAGGERMAN et al., 2003). Pelo fato das proteínas sofrerem diversas modificações pós-traducionais até se tornarem funcionais, tais como acetilação, fosforilação ou clivagem proteolítica, os estudos de suas estruturas finais e funções exercidas não podem ser definidos apenas a partir das sequências nucleotídicas do DNA e RNA responsáveis por sua síntese (WILKINS e HOCHSTRASSER, 1996; CAHILL et al., 2001). O maior número de proteínas identificadas (cerca de 110.000) em relação ao número de genes encontrados em plantas superiores (cerca de 40.000) sustenta esta insuficiência de dados nucleotídeos perante o potencial de informação biológica a ser explorado com estudos envolvendo as proteínas (YU et al., 2005; RABINOWICZ et al., 2005; CANNON et al., 2006; DAVIES, 2009). O ideal é que os estudos em DNA, RNA e proteínas possam ocorrer em paralelo de forma que as informações geradas nos diferentes níveis possam se complementar e auxiliar no melhor entendimento dos

processos biológicos que acontecem nas células (COOK et al., 2004; GRAY e HEATH, 2005).

Os estudos em genômica funcional que buscam compreender como e quando os genes são expressos, quais suas interações com outros genes e como são regulados, podem ser desenvolvidos nos diferentes níveis em que os genes se expressam, ou seja, a partir do RNA transcrito pelo gene ou a partir da tradução deste RNA em moléculas de proteínas ou metabólitos, e dessa forma surgem os termos transcriptoma, proteoma e metaboloma, respectivamente. O termo “proteoma” foi proposto em 1993 por Mark Wilkins e Keith Williams para referir-se à identificação sistemática do complemento protéico total do genoma (BLACKSTOCK e WEIR, 1999; LOPEZ, 1999) e dois anos depois Kamo et al. (1995) publicaram o primeiro trabalho em larga escala em proteoma de plantas, que se deu em *Arabidopsis thaliana*.

A idéia da genômica em estudar as proteínas por meio do sequenciamento de seus genes, por si só não pode prever toda a estrutura dinâmica de um proteoma. Assim, a busca pelo entendimento da expressão, da função e da regulação das proteínas codificadas pelos genes de um organismo, associado aos conhecimentos genômicos foi responsável por mudanças nos rumos das pesquisas em biologia molecular moderna, dando início à chamada Era Proteômica (LESLEY, 2001; DHINGRA et al., 2005).

2.5.1 Proteômica de plantas

Os avanços tecnológicos em biologia molecular e a consequente disponibilidade de um maior número de genomas parcial ou completamente sequenciados tem permitido estudos mais abrangentes e incisivos acerca das proteínas expressas pelos organismos em diferentes situações. Dessa forma, diversas plantas, principalmente de interesse comercial e econômico, tem sido analisadas com base nos proteomas expressos por seus tecidos, entre elas a mandioca (CABRAL et al., 2001), a batata (LEHESRANTA et al., 2005), o trigo

(BAHRMAN et al., 2005), o arroz (KOMATSU et al., 2003; SALEKDEH et al., 2002), a soja (HADJUCH et al., 2005; KOMATSU e AHSAN, 2009) e espécies cítricas (MASERTI et al., 2007; SHI et al., 2008).

Em plantas, o preparo da amostra protéica é uma etapa crítica e absolutamente essencial para a obtenção de bons resultados proteômicos. Neste sentido, especial atenção deve ser destinada a esta etapa e diferentes métodos de extração podem ser testados e utilizados para isolar e fracionar as proteínas dos materiais vegetais (CARPENTIER et al., 2005; NATARAJAN et al., 2005).

Os tecidos vegetais possuem grande quantidade de água e baixa relação proteína/matéria fresca, além de possuírem substâncias que interferem na análise protéica como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenóides, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos. Após a extração, geralmente as proteínas são precipitadas em soluções salinas, tamponantes e/ou solventes orgânicos, visando eliminação da maioria dos interferentes. A seleção da solução extratora ideal, aquela que solubiliza a maior quantidade de proteínas, depende de cada espécie, tecido e das proteínas de interesse. As diferentes soluções extradoras possuem afinidades com classes específicas de proteínas, o que permite uma extração diferencial de acordo com o método utilizado. Os métodos mais utilizados para extração de proteínas totais em células e tecidos vegetais utilizam soluções caotrópicas, geralmente a base de uréia e tiouréia ou diretamente com ácido tricloroacético (TCA)/Acetona seguido de pelo menos um método de precipitação para a concentração das proteínas e a eliminação dos interferentes (SARAVANAN e ROSE, 2004; CARPENTIER et al., 2005; NATARAJAN et al., 2005). Metodologias empregando TCA em acetona e em solução aquosa com posterior extração em tampão contendo fenol/SDS apresentam bons resultados, principalmente em espécies recalcitrantes (WANG et al., 2003; CARPENTIER et al., 2005)

Estudos comparativos de proteomas de plantas são predominantemente realizados com as tradicionais técnicas de eletroforese bi-dimensional em géis de poliacrilamida (2-D PAGE), com focalização isoeletrica na separação das proteínas em primeira dimensão e SDS-PAGE na segunda

dimensão (O' FARRELL, 1975). Por esta técnica, proteínas exibindo diferenças na abundância entre as amostras biológicas são reveladas por comparação de padrões densitométricos de intensidades dos spots entre os diferentes géis revelados pela coloração com prata ou Coomassie Blue. As limitações relacionam-se a sensibilidade, dinâmica e reprodutibilidade da quantificação das proteínas entre os géis; porém, com o desenvolvimento de novas matrizes e técnicas analíticas, como a tecnologia DIGE (Difference Gel Electrophoresis) que emprega corantes com espectros fluorescentes diferenciais nas proteínas dos tratamentos antes da eletroforese, atualmente é o modo mais direto para mapear o proteoma de um organismo com maior sensibilidade (LOPEZ, 1999; CAHILL et al., 2001).

A espectrometria de massa (MS), que permite identificar rapidamente um grande número de proteínas em amostras com baixa concentração possibilitou um enorme avanço na área da proteômica. Em 2002, John Feen, Kurt Wetrich e Koichi Tanaka dividiram o prêmio Nobel em química pelo aprimoramento das técnicas de ionização brandas utilizadas em ionização por electrospray (ESI) e ionização por remoção a laser assistida por matriz (MALDI) (UNICAMP, 2007). Os modos de ionização por ESI e MALDI possibilitaram análises em amostras biológicas e atualmente as duas tecnologias são as mais utilizadas para ionização de proteínas e subsequente identificação em bancos de dados (LIPTON et al., 2002; ZHOU et al., 2002; SALAKDEH et al., 2002; BAE et al., 2003; SHEN et al., 2003). Adicionalmente, a identificação de proteínas tornou-se possível graças ao grande desenvolvimento tecnológico que ocorreu também na área computacional, onde a bioinformática atua como ferramenta fundamental tanto na criação dos bancos de dados com seqüências de nucleotídeos e de peptídeos, quanto na análise integrada de todos os dados gerados pela eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa.

A aplicação das técnicas proteômicas empregando estratégias quantitativas de espectrometria de massa (MS) oferece a oportunidade única de simultaneamente identificar proteínas e descobrir diferenças na abundância entre proteomas em uma escala global. Conhecimentos bioquímicos de fracionamento podem facilitar estudos de proteomas comparativos, descritivos e diferenciais,

permitindo uma visão mais detalhada acerca da localização sub-celular, interações proteína-proteína, modificações pós-traducionais, dinâmica e volume das proteínas em seu contexto funcional (OELJEKLAUS et al., 2009). Esses estudos têm sido realizados em pelo menos 50 espécies diferentes de plantas. Todos estes aspectos tem sido extensivamente revisados e uma série de bancos de dados com acesso a proteomas e géis bidimensional estão disponíveis (<http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>) (CHEN e HARMON, 2006; JORRIN et al., 2006; THELEN e PECK, 2007).

A aplicação dos dados de proteômica de plantas pode contribuir em diferentes áreas, incluindo a biomedicina, através da identificação e caracterização de substancias alérgicas (GONZÁLEZ-BUITRAGO, 2007; JORRÍN-NOVO et al., 2009), a agronomia, através de estudos de equivalência de culturas transgênicas (SALEKDEH e KOMATSU, 2007), genotipagem (ALM et al., 2006; HAJDUCH et al., 2007) e estudos de heterose (HOECKER et al., 2008) e também em áreas de ciências dos alimentos, através de estudos de controle de qualidade (SAZ e MARINA, 2007).

2.5.2 Proteômica de plantas sob estresses abióticos

Estudos proteômicos tem sido utilizados para obter conhecimentos mais aprofundados acerca dos processos biológicos que ocorrem em organismos submetidos a estresses bióticos e abióticos. Os tipos de estresse mais estudados constituem os estresses por patógenos, seguidos por estresse hídrico, por metais pesados, estresse salino e osmótico e, embora haja diversidade quanto às espécies analisadas, a maioria dos estudos proteômicos se concentrou em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (arroz). Os tecidos vegetais empregados nas análises de proteomas também são diversificados, destacando-se trabalhos com cotilédones, folhas, raízes, frutos, fluído apoplástico, mudas, brotos, segmentos caulinares, sementes, frações nucleares e tecidos meristemáticos (JORRIN-NOVO, 2009). Mudanças na expressão de proteínas em resposta ao déficit hídrico tem sido estudadas em diversas plantas (RICCARDI et al., 1998;

SALEKDEH et al., 2002; ABBASI e KOMATSU, 2004; HAJHEIDARI et al., 2005; ALI e KOMATSU, 2006; HAJHEIDARI et al., 2007) e dentre as proteínas expressas diferencialmente em resposta a estresses, aquelas envolvidas com tolerância ao estresse oxidativo são as mais abundantes, o que faz sentido considerando que a maioria dos estresses aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas.

Salekdeh et al. (2002) identificaram 16 proteínas expressas diferentemente em resposta ao déficit hídrico em arroz a partir de abordagens proteômicas. O trabalho mostrou que proteínas como a S-like RNase homóloga, rubisco activase e o fator de alongamento de actina mostraram-se mais expressas sob o déficit, enquanto a isoflavona reductase-like protein tem expressão diminuída em situação de estresse. Ali e Komatsu (2006) também observaram maiores níveis das proteínas fator de alongamento de actina, superóxido dismutase e proteínas sal-induzidas devido ao déficit hídrico e estresse osmótico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de desenvolvimento

Para a condução dos experimentos foram utilizados dois grupos distintos de plantas com cerca de cinco anos de idade. Um dos grupos (T) foi formado a partir de três plantas multiplicadas por estaquia de um evento de transformação (CT-P5-20) do porta-enxerto citrumelo “Swingle” (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) contendo uma cópia do transgene mutante de *Vigna aconitifolia* P5CSF129A sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, o que proporciona alto acúmulo do aminoácido prolina devido à superexpressão de gene que codifica para a enzima-chave na biossíntese de prolina Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS) via glutamato. Os clones de citrumeleiros foram obtidos por micropropagação *in vitro* de acordo com o protocolo estabelecido por Molinari et al. (2004). O segundo grupo, controle (C), foi também formado por três plantas do porta-enxerto citrumelo “Swingle” multiplicadas vegetativamente e que foram obtidas seguindo os mesmos protocolos de cultura de tecidos utilizados para transformação das plantas do primeiro grupo (T), porém, sem o co-cultivo com *Agrobacterium*.

As plantas dos dois grupos foram mantidas sob mesmas condições ambientais em casas de vegetação pertencentes ao Instituto Agronômico do Paraná, em Londrina – PR, com controle de irrigação, temperatura, fotoperíodo e umidade relativa do ar. Estas plantas foram cultivadas em vasos com capacidade para 20 L de substrato (mistura de 2:1 (v/v) entre solo e substrato Plantmax®) e submetidas a podas anuais para manterem tamanho de copa similar. Adubações periódicas foram realizadas com Osmocote® (OSMOCOTE PLUS – Scotts Sierra Horticultural Products Company) na proporção de 3 kg m⁻³ de substrato.

3.2 Experimento de déficit hídrico

Inicialmente, água foi adicionada nos vasos contendo os dois grupos de plantas para atingir a capacidade de campo, que foi verificada a partir do escoamento do excesso de água dos vasos. Com a finalidade de monitorar o teor de água retida nos solos, foram utilizadas sondas TDR – Time Domain Reflectometry (Reflectometria no domínio do tempo). As hastes de metal foram inseridas nos solos a uma profundidade de 30 cm e as leituras foram realizadas em analisador portátil Tektronix 1502B Mettalic TDR Cable Tester.

O instrumento TDR estabelece a constante dielétrica do solo através da medição do tempo (t) de um pulso eletromagnético, emitido em barras condutoras paralelas cravadas no solo, alcançar seu final e retornar ao ponto de emissão. Os valores da constante dielétrica do solo são posteriormente convertidos em valores de umidade, com base em volume, a partir do polinômio de terceiro grau sugerido por Topp et al. (1980):

$$\theta = -5,3 \times 10^{-2} + 2,9 \times 10^{-2} \varepsilon - 5,5 \times 10^{-4} \varepsilon^2 + 4,3 \times 10^{-6} \varepsilon^3,$$

onde ε é a constante dielétrica do solo e θ é o valor de umidade volumétrica.

O monitoramento hídrico pelas sondas de TDR foi realizado diariamente durante todo o período experimental e as leituras feitas na parte da manhã (em torno das 09h00 min).

As plantas controle e transgênicas foram submetidas a dois diferentes tratamentos hídricos: irrigado e estressado, no qual os pontos de coleta do material foliar para análises foram determinados pelas medidas de potencial hídrico total (Ψ_t). O estado hídrico nas folhas foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A.) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, discos foliares de aproximadamente 2 cm² de cada planta foram dispostos nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi

convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio.

O tratamento irrigado consistiu de suprimento hídrico aproximado às condições de capacidade de campo. Após a coleta de folhas referentes ao tratamento irrigado (Ψ_t variando de -1,1 a -1,5 MPa), o suprimento hídrico foi interrompido para todas as plantas até o estabelecimento do nível de estresse desejado (Ψ_t variando de -3,0 a -3,5 MPa).

O material vegetal coletado foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer com temperatura -80°C . As amostras foliares foram separadas em 4 tratamentos: controle irrigado (CI), transgênico irrigado (TI), controle estressado (CE) e transgênico estressado (TE). As repetições biológicas foram representadas por três pools de folhas coletados das plantas controle e três pools de folhas das plantas do evento transgênico em cada condição hídrica (irrigado e estressado).

3.3 Quantificação de Prolina

A quantificação dos teores de prolina livre nas amostras foliares foi realizada com base no protocolo desenvolvido por Bates et al. (1973). Aproximadamente 30 mg do tecido foliar foi macerado em cadinhos de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido. O extrato obtido foi pesado e homogeneizado em solução de 3% ácido sulfossalicílico (m/v). Após centrifugação (7500 rpm) por 10 min, 2 mL do sobrenadante foram coletados e misturados a 2 mL de ácido acético glacial e 2 mL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de 6 M ácido fosfórico). As amostras foram incubadas a 100°C por 1 h e em seguida colocadas em gelo para finalizar a reação. Quatro mL de tolueno foram adicionados à solução e, após agitação por 20 s em vortex, o sobrenadante foi utilizado para as leituras de absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu UV 1650 PC) com comprimento de onda fixado em 520 nm. A curva-padrão de prolina foi realizada em concentrações conhecidas variando de 0 a $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. As leituras foram obtidas em triplicata e os

resultados expressos em micromol de prolina por grama de massa fresca ($\mu\text{mol. g MF}^{-1}$).

3.4 Extração de proteínas

Proteína total das amostras foliares foi extraída com base no método fenol/SDS descrito por Wang et al. (2003). O método consiste na extração a partir do fenol com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) que atua como um detergente aniônico e ajuda na solubilização das proteínas. O processo de extração seguiu conforme o protocolo, porém empregando maior volume de amostra e, consecutivamente, maior volume de reagentes de modo a se adequar às proporções sugeridas (MALIK e BRADFORD, 2005).

Amostras de folhas maceradas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em solução tampão [(2% β -mercaptoetanol (v/v), 1% PVPP (Poli-vinil-poli-pirrolidona) (m/v), 1 mM PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoreto) e 90% acetona (v/v)] e repousadas por 40 min em tubos de polipropileno. As amostras tamponadas foram agitadas em aparelho vortex por 30 s e sonicadas (*Fisher Scientific Sonic dismembrator, model 500*), em presença de gelo, por 3 ciclos de 25 s operando em 30% de potência. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8500 rpm por 15 min a 4 °C e submetidas a lavagens sequenciais com acetona pura gelada, com 10% TCA em acetona (m/v), com 10% TCA em água (m/v), com 80% acetona (v/v) e com 70% etanol (v/v) para a remoção dos compostos interferentes. O material foi colocado para secar a 35°C *overnight*.

Os extratos vegetais secos foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e homogeneizados em tampão SDS denso [SDS 2% (m/v); sacarose 30%; 0,1 M Tris-HCl - pH 8,8; 1 mM PMSF e 2% (v/v) B-mercaptoetanol]. Após repouso em gelo por cerca de 20 min, foi acrescentado de 7-10 mL de solução de fenol tamponado (Ultra Pure Buffer saturated Phenol, pH 7,3) e os tubos foram centrifugados a 8500 rpm por 10 min a 4 °C. A camada de SDS delimitou uma fase superior fenólica contendo as proteínas solubilizadas e esta foi coletada e precipitada em 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol a -20 °C por

pelo menos 40 min. Os tubos contendo as proteínas precipitadas foram centrifugados a 8000 rpm em 4 °C por 30 min e o pellet formado foi lavado para eliminar completamente os resíduos de fenol com acetato de amônio 0,1 M em metanol, com acetona 80% por duas vezes e, finalmente, procedeu-se uma última lavagem com etanol 70%. O pellet de proteínas obtido foi colocado em temperatura ambiente até que ficasse totalmente seco.

O pellet seco foi ressuspensionado em tampão de solubilização [7M uréia; 2 M tioureia e 4% (v/v) CHAPS (3-[3-cholamidopropil-dimetilamonio]-1-propanosulfonato] e deixado em repouso cerca de 2 h em temperatura ambiente até ser submetido ao sonificador por 3 ciclos de 20 s em potência 15% para obter soluções protéicas mais concentradas.

3.5 Quantificação de proteínas

As amostras solubilizadas foram quantificadas conforme o método de Bradford (1976), utilizando como referência curva-padrão de soroalbumina bovina (BSA) em concentrações conhecidas variando de 0 a 30 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda fixo de 595. O material quantificado foi separado em alíquotas contendo aproximadamente 600 μg de proteínas e estas foram armazenadas em freezer - 80 °C até o momento de separação por eletroforese bi-dimensional (2D).

3.6 Eletroforese bi-dimensional

3.6.1 Re-hidratação das amostras

Anteriormente ao processo eletroforético, as amostras solubilizadas foram ressuspensionadas em 50 mM DTT, 1% solução de anfólitos IPG buffer (pH 4-7) (v/v) e solução tampão de re-hidratação *DeStreak*TM, que possui quantidades otimizadas de uréia, tiouréia, CHAPS e mais o reagente *destreak*.

As amostras foram preparadas de forma a totalizar um volume final de 250 μL (máximo absorvido pelas fitas de 13 cm utilizadas). Após o preparo das amostras, estas foram homogeneizadas e centrifugadas (2 min a 12000 rpm) para eliminar bolhas da solução.

As amostras preparadas foram aplicadas diretamente nas canaletas do recipiente *Reswelling Tray* (Amershan Biosciences), distribuindo-se a amostra ao longo da superfície da canaleta (Figura 3). As fitas foram então inseridas nas canaletas contendo a amostra de forma que a região do gel ficasse em contato direto com a amostra. Por fim, adicionou-se o óleo mineral – *Dry Strip Cover Fluid*, em volume apropriado para cobrir as tiras. Esta etapa de re-hidratação foi realizada em temperatura ambiente (20-25 °C) por cerca de 18 h.

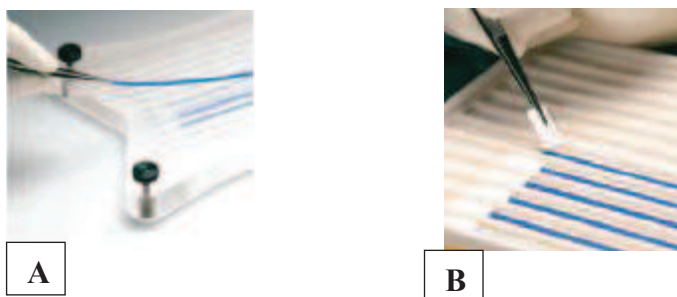


Figura 3 - Etapa de re-hidratação das amostras nas tiras IPG. A - Tiras manipuladas e colocadas no *Reswelling Tray*. B - Tiras hidratadas inseridas em *manifold* para focalização.

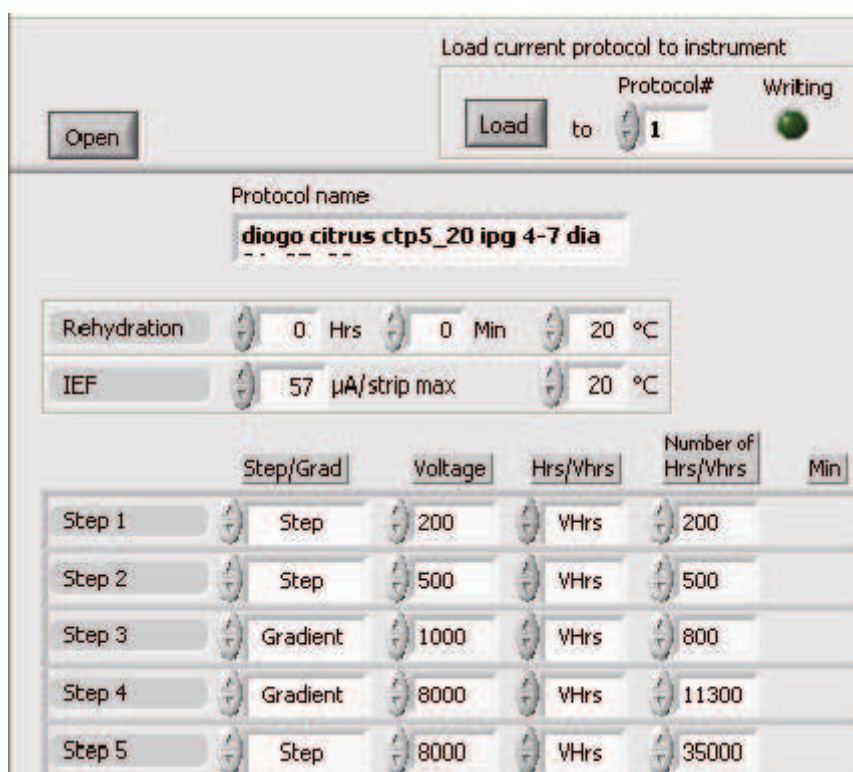
3.6.2 Focalização isoeétrica (IEF)

A isoeletrofocalização das proteínas contidas nas amostras foi realizada em aparelho Ettan IPGphor II utilizando-se tiras de 13 cm de comprimento (IPG *strips*, G.E Healthcare) contendo gel de poliacrilamida fixado e com pH imobilizado na faixa entre 4-7.

Passada a etapa de re-hidratação, as tiras foram transferidas das canaletas do *Reswelling Tray* para as canaletas de um *manifold* com o auxílio de uma pinça (Figura 3B). As extremidades das tiras foram flanqueadas por papéis filtro (*electrode paper wick*, G.E Healthcare) previamente hidratados com água

ultrapura MilliQ e os eletrodos foram inseridos diretamente nestes papéis filtro que faziam o contato entre o eletrodo e o gel. Para a manutenção da temperatura durante o período de focalização, novamente foi adicionado óleo mineral sobre as canaletas até a imersão total das tiras

Os parâmetros adotados na corrida eletroforética em primeira dimensão foram fixados por meio do software Ettan IPGphor II versão 2.1. A temperatura estipulada foi de 20 °C, com amperagem máxima de 57 µA por tira e a migração das proteínas foi realizada em 5 etapas, ou seja em cinco programas de voltagem: 1 - Step: 200 volts com acúmulo de 200 VHrs; 2 - Step: 500 volts com acúmulo de 500 VHrs; 3 - Gradiente: 800 volts com acúmulo de 1000 VHrs; 4 - Gradiente: 8000 volts com acúmulo de 11300 VHrs; 5 - Gradiente: 8000 volts com acúmulo 35000 VHrs (Figura 4).



Load current protocol to instrument

Open Load to Protocol# 1 Writing

Protocol name: **diogo citrus ctp5_20 ipg 4-7 dia**

Rehydration: 0 Hrs 0 Min 20 °C

IEF: 57 µA/strip max 20 °C

	Step/Grad	Voltage	Hrs/Vhrs	Number of Hrs/Vhrs	Min
Step 1	Step	200	VHrs	200	
Step 2	Step	500	VHrs	500	
Step 3	Gradient	1000	VHrs	800	
Step 4	Gradient	8000	VHrs	11300	
Step 5	Step	8000	VHrs	35000	

Figura 4 - Protocolo utilizado na separação de proteínas referentes aos tecidos foliares de citrumelo 'Swingle' em primeira dimensão com tiras IPG de 13 cm em intervalo de pH 4-7. Imagem obtida a partir do software Ettan IPGphor II versão 2.1 (Amershan Biosciences – GE Healthcare)

3.6.3 Equilíbrio das tiras

Após o processo de focalização isoeletrica (IEF), as tiras foram submetidas a uma etapa de equilíbrio antes da etapa posterior de separação por peso molecular (SDS-PAGE), descrita no tópico seguinte. Nesta etapa de equilíbrio, as tiras foram tratadas sequencialmente com duas soluções a base de Tampão de Equilíbrio (T.E.), composto por 6 M uréia, 75 mM Tris-HCl - pH 8,0, 29,3% glicerol (v:v), 2% SDS (m:v) e 0,002% solução corante de bromofenol blue (m:v).

-Solução A: Corresponde a solução de tratamento inicial, composta por T.E. mais DTT (ditiotretol) numa proporção de 25 mg.mL^{-1} de T.E. Após solubilização total com agitação (15 min), 5 mL desta foi adicionada diretamente nos frascos de vidro contendo as tiras e o equilíbrio se deu com agitação lenta durante 25 min.

-Solução B: Após o equilíbrio com a solução A, que possibilitou a redução das proteínas e clivagem das ligações dissulfeto pelo emprego de DTT, esta foi escoada dos frascos e, em seguida, adicionou-se a solução B. Esta solução foi formada a partir do mesmo Tampão de Equilíbrio (T.E.) da solução anterior, porém, ao invés de DTT, foi adicionado iodoacetamida na proporção de 40 mg.mL^{-1} de T.E. Esta solução ficou em equilíbrio com as tiras também por 25 min sobre lenta agitação no escuro (frascos envoltos em papel alumínio) devido às propriedades fotoquímicas da iodoacetamida. Esta solução possibilitou a alquilação das proteínas das amostras.

3.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS PAGE

A etapa de separação de proteínas das amostras pelo processo de eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) foi realizada em cuba Hoefer SE 600 Ruby (Amershan Biosciences). Os géis de poliacrilamida utilizados no processo eletroforético foram preparados em concentração final 11% de acrilamida, segundo o protocolo demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo adotado para solução de gel em concentração 11% de acrilamida para volume final de 100 mL.

Estoque	Volume (mL)
Monômeros (30% T e 2,6% C)	37,5
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	25
SDS 10%	1
Água bi-destilada	36
Persulfato de Amônio 10%	0,5
TEMED	0,33

As tiras de gel anteriormente equilibradas foram seladas na superfície dos géis SDS PAGE com auxílio de solução de agarose 0,5 % em presença de azul de bromofenol e posteriormente foi dado início ao processo de separação 2D das proteínas.

A cuba foi acoplada a uma bomba refrigeradora para manter o sistema com temperatura próxima a 10 °C e o processo de eletroforese foi realizado em duas etapas sequenciais: 1 - corrente de 12 mA em cada gel por 35 min e 2 - corrente 30 mA em cada gel por cerca de 220 min.

3.7 Fixação das proteínas e coloração dos géis

Após o processo de eletroforese, os géis bi-dimensionais foram transferidos para recipiente de plástico com solução fixadora com 10% ácido acético (v/v), 40% etanol (v/v) e 50% ddH₂O (v/v). Os géis ficaram imersos nesta solução sob agitação lenta em mesa agitadora por cerca de 3 h.

Após o processo de fixação das amostras de proteínas nos géis, estes foram submetidos à coloração em solução coloidal de comassie blue G-250 (8% sulfato de amônio, 8% ácido fosfórico, 0,08% coomassie blue G-250 e 20% metanol). Os géis ficaram corando por 36 h e, depois de retirada a solução

corante, os géis foram lavados por 3-4 vezes em água destilada ou até a remoção do excesso de corante.

3.8 Captura das imagens dos géis e análise *in silico* dos spots

As imagens dos géis bi-dimensionais foram capturadas utilizando ImageScanner UMAX e programa de digitalização Lab Scan. O *scanner* foi inicialmente calibrado com fitas de calibração fornecidas pelo fabricante e as imagens digitalizadas em resolução de 300 dpi foram salvas nos formatos TIF e MEL, e as imagens em formato MEL foram analisadas pelo programa ImageMaster Platinum 6.0 para a detecção dos spots. Os géis de mesmo tratamento foram agrupados e comparados para a seleção de um gel de referência em cada um dos tratamentos (CI, TI, CE e TE). Três diferentes comparações foram realizadas com base nestes géis de referência: 1) controle irrigado x transgênico irrigado, 2) controle irrigado x controle estressado e 3) transgênico irrigado x transgênico estressado.

3.9 Extração de proteínas dos spots

Spots diferencialmente expressos entre os tratamentos foram escolhidos, identificados e recortados diretamente dos géis. Considerou-se como expressão diferencial a presença ou ausência de spots ou ainda a expressão com diferença volumétrica de pelo menos 1,5 vezes quando comparado com o mesmo spot em outro gel.

Os spots selecionados virtualmente (*in silico*) foram identificados no gel de trabalho e manualmente foram recortados com auxílio de uma ponteira de pipeta de 1000 µL. Os spots retirados dos géis foram transferidos para micro tubos estéreis de 1,5 mL. Para a etapa de desidratação foram acrescentados 30 µL de 75 mM bicarbonato de amônio (AMBIC) em 40% etanol em cada tubo contendo os pedaços de gel. Os processos de agitação, repouso por 10 min e

remoção do sobrenadante foram efetuados por 4-8 vezes ou até observar os pedaços de gel totalmente descoloridos.

A etapa seguinte de desidratação foi realizada com 25 μ L de 100 % acetonitrila (ACN) por tubo. As mesmas etapas de agitação, repouso (10 min) e descarte de sobrenadante foram realizadas por 3-4 vezes até a desidratação completa dos pedaços de gel. Após a última lavagem, os pedaços de gel foram colocados para secar em “speed-vac” por 25 min.

3.10 Clivagem enzimática

Com os spots secos e descolorados, deu-se início ao processo de clivagem das proteínas. Para tanto, foi preparada solução enzimática com tripsina (Invitrogen/Applied Biosystems) solubilizada em ácido acético em concentração 10 μ g.mL⁻¹. Dez μ L de solução enzimática tamponada em 25 mM AMBIC foram acrescentados em cada tubo contendo os spots secos para rehidratação destes com a solução enzimática. Após 45 min em gelo, foi acrescentado mais 10 μ L de tampão 25 mM AMBIC e os tubos foram colocados em estufa a 37 °C *overnight*.

A extração dos peptídeos gerados pela clivagem das proteínas foi feita adicionando-se 30 μ L de solução extratora (50% ACN, 5% TFA, 45% água ultrapura) em cada tubo. Os tubos foram colocados em repouso durante 45 min em temperatura ambiente e o sobrenadante contendo solução peptídica foi retirado e transferido para outro tubo. Novamente foram adicionados mais 30 μ L de solução extratora e esta ficou agindo *overnight*. O sobrenadante obtido foi recolhido, transferido ao tubo contendo solução peptídica e reservado até análise por espectrometria de massa.

3.11 Espectrometria de massa

3.11.1 Cristalização das amostras

Inicialmente as amostras contendo os fragmentos trípticos foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 200 μ L e centrifugadas em “speed-vac” para redução do volume e concentração das amostras.

O volume de 1 μ L de amostra foi misturado com mesmo volume de matriz de solidificação (5 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico solubilizado em 1 mL de solução 5% TFA e 5% acetonitrila) e colocadas nos poços da placa do espectrômetro de massa. As amostras foram deixadas em repouso por 5 min para a cristalização total das amostras antes de serem ionizadas.

3.11.2 Detecção dos espectros de massa dos peptídeos

As análises dos fragmentos peptídicos foram feitas em espectrômetros de massa MALDI-TOF-TOF Ultra Flex (Bruker Daltonics) pertencentes ao Laboratório de Espectrometria de Massas (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen e ao Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular da UFPR. Os espectrômetros operam com fonte de ionização do tipo MALDI (matriz assisted laser desorption ionization) e dois analisadores iônicos do tipo Tof (Time of Flight) acoplados em tandem (MS/MS).

O equipamento foi manipulado a partir do programa Flex Control (Bruker Daltonics) para o ajuste dos parâmetros durante o processo de análise, que incluem o número de ‘tiros’ e a percentagem de radiação para a ionização das amostras. A cada sequência de ionização, os íons detectados e processados geraram informações de relação massa/carga e intensidade de cada íon detectado, as quais foram somadas e deram origem ao espectro de massas ms1 dos fragmentos trípticos de cada amostra analisada. Também foram gerados

espectros de massa ms2 (ms/ms) a partir da fragmentação dos espectros ms1 selecionados e analisados em modo *Lift* pelo programa destacado Flex Control.

3.11.3 Análise dos espectros e identificação de proteínas

A visualização e análise dos espectros de massa MS e MS/MS foi feita a partir do programa Flex Analysis 3.0. Os espectros de massa ms1 gerados pelo MALDI-TOF-TOF forneceram dados necessários de relação carga/massa (m/z) e intensidade para a identificação de proteínas pelo método PMF (Peptide Mass Fingerprinting), utilizando a plataforma do Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) e o banco de dados de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os três peptídeos mais intensos dos espectros ms1 foram selecionados, fragmentados e o espectro de massa ms2 gerado possibilitou identificação de proteínas pelos métodos MS/MS íon search, na plataforma do Mascot, ou pelo método de sequenciamento manual (sequenciamento *de novo*), no qual a sequência de aminoácidos do espectro ms2 gerada foi comparada dentro do banco de dados de proteínas pertencente ao NCBI a partir da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) assinalando a opção BlastP. O programa de análises de espectros PepSeq foi utilizado no processo de sequenciamento manual dos espectros ms2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros hídricos no solo e na planta

O monitoramento do volume de água retido no substrato a partir das leituras de TDR possibilitou determinar o conteúdo de água no substrato dos vasos das plantas controle não transformadas (C) e das plantas transgênicas (T) apresentando o gene *P5CSF129A* (Figura 5).

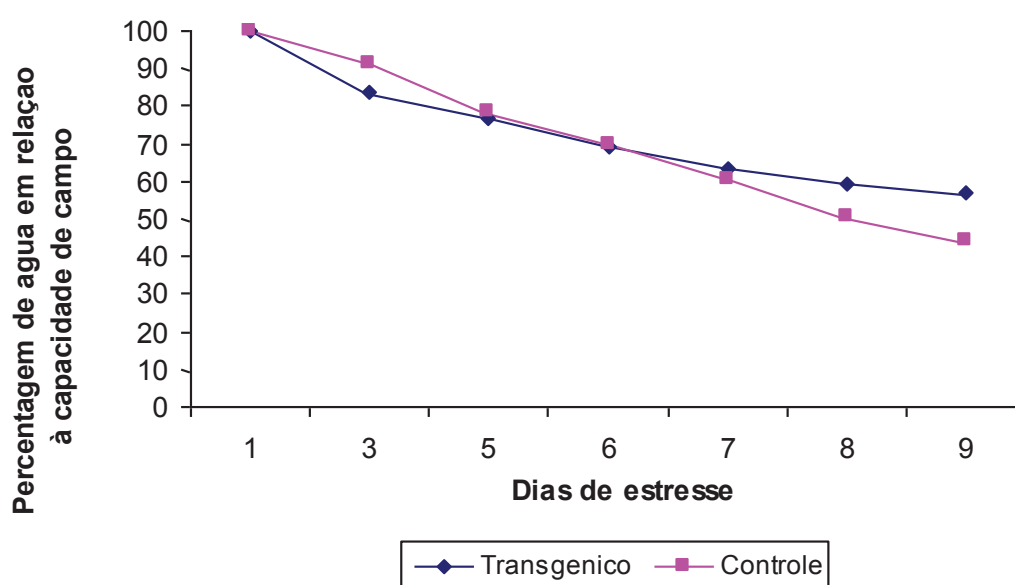


Figura 5 - Porcentagem de água no substrato em relação à capacidade de campo (%) de vasos de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica.

Os valores de capacidade de campo (CC) dos grupos foram obtidos a partir da equação de Topp et al. (1980). Os valores de θ foram utilizados para estimar a quantidade de água presente no solo após a paralisação da irrigação e são apresentados em porcentagem relativa à quantidade máxima absorvida pelo solo saturado (CC) (Figura 5). Os valores mantiveram-se equivalentes até o sexto dia (ambos com cerca de 70% da CC) e a partir do sétimo dia de estresse o conteúdo de água no substrato de vasos com as plantas transgênicas já se apresentavam superiores aos com as plantas controle. No ultimo dia de estresse

(dia 9), os solos dos vasos com plantas transgênicas apresentavam cerca de 60% da CC, sendo que os nos vasos controle apresentavam apenas 50% de sua CC.

Os dados obtidos pelas sondas TDR permitem estimar as condições hídricas no solo, mas estas não são capazes de fornecer informações acerca da situação de água nas plantas. Dessa forma, os parâmetros que permitiram determinar a condição hídrica e o nível de estresse nas folhas das plantas foram obtidos a partir do potencial hídrico das folhas em leituras com os psicrômetros de termopar acoplados a datalogger. Como o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do estresse na expressão de proteínas em nível celular, a coleta segundo o potencial hídrico total é mais adequada para a amostragem do que dias de submissão ao déficit hídrico.

Dessa forma, por atingir condições severas de estresse mais rapidamente, as coletas de folhas das plantas controle foram feitas antes das coletas nas plantas transgênicas, buscando desta forma níveis de potencial hídrico semelhantes entre as amostragens. Enquanto folhas das plantas controle foram coletadas nos dias 7 e 8 após a retirada da irrigação, as coletas de material de plantas transgênicas sob as mesmas condições de estresse foram feitas entre os dias 8 e 9. Nestes dias as folhas das plantas controle e transgênica apresentavam potencial hídrico (Ψ_t) entre -3,0 e -3,5 MPa. O decréscimo progressivo no potencial de água nas folhas de citrumelo “Swingle” submetidos à deficiência hídrica foi observado por Cerqueira et al. (2004) com porta-enxertos de limoeiros 'Cravo' e 'Volkameriano', que apresentaram valores de potencial hídrico -3,2 e -3,3 MPa, respectivamente. Estes valores de potenciais hídricos estão em acordo com valores encontrados para plantas mesófitas cultivadas sob estresse e semelhantes ao encontrados neste trabalho.

4.2 Teores de prolina

A quantidade de prolina livre em folhas de citrumeleiro “Swingle” foi medida em plantas controle e transgênicas em condições normais de irrigação (Ψ_t = -1,1 MPa a -1,5 MPa) e de déficit hídrico (Ψ_t = -3,0 MPa a -3,5 MPa). As plantas

transgênicas apresentaram maior quantidade de prolina por grama de massa fresca que as controle nas duas condições hídricas em que foram submetidas (Figura 6).

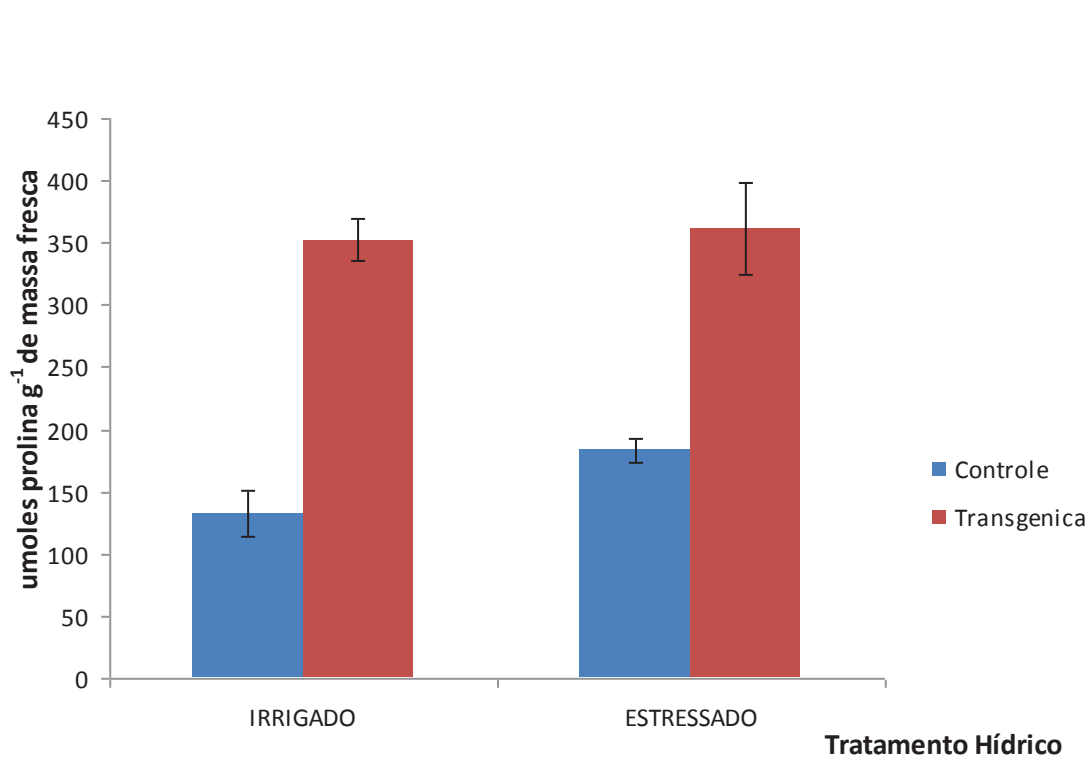


Figura 6 - Teor de prolina livre em folhas de plantas controle não-transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em condições normais de suprimento hídrico ($\Psi_t = -1,1$ MPa a $-1,5$ MPa) e sob déficit hídrico ($\Psi_t = -3,0$ MPa a $-3,5$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão (n=3).

Em condições normais de suprimento hídrico, as plantas transgênicas demonstraram possuir cerca de 2,5 vezes mais prolina que as plantas controle. O teor de prolina livre nas folhas das plantas deste último grupo aumentou conforme o estabelecimento do estresse, partindo de valor médio de $125 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$ em condição irrigada para $175 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$ na situação de estresse, o que corresponde um acréscimo de 40%, mas ainda bem abaixo do obtido em plantas transgênica sob as mesmas condições hídricas. Este acúmulo de prolina durante o estresse é esperado e está em acordo com os trabalhos envolvendo outras espécies de plantas submetidas a condições de estresse (BORSANI et al., 2005; SEKI et al., 2007; HOQUE et al., 2008).

A quantidade de prolina livre detectada nas folhas dos citrumeleiros, mesmo em condição irrigada, é elevada quando comparada com teores encontrados em folhas de outras plantas, como por exemplo em folhas de tabaco (HONG et al., 2000) o que é característico em espécies do gênero *Citrus* (MOLINARI et al., 2004). Em condição irrigada o valor médio de prolina nas plantas controle foi de $125 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$ e nas plantas transgênicas foi $350 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$, mostrando que o acréscimo proporcionado pela expressão do transgene em situação normal de suprimento de água foi de $225 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$. Sob déficit hídrico as plantas transgênicas de citrumelo “Swingle” não mostraram aumento expressivo dos teores de prolina livre ($\pm 375 \mu\text{mol g. MF}^{-1}$), o que provavelmente indica o limite máximo de acumulação deste aminoácido nas folhas deste porta-enxerto.

Em algumas espécies de plantas, a deficiência hídrica pode induzir ajustamento osmótico resultando, durante a condição de estresse, na manutenção da turgescência celular mesmo sob baixos potenciais hídricos. O acúmulo de solutos compatíveis tem sido destacado neste processo de ajustamento, sendo que a prolina constitui um dos principais solutos envolvidos (HASEGAWA et al., 2000.; ASHAF e FOOLAD, 2007). A maior quantidade de prolina livre presente nas plantas transgênicas provavelmente permitiu a estas plantas um maior ajustamento osmótico celular e auxiliou na maior tolerância sob o déficit hídrico imposto, conforme demonstrado por Molinari et al., 2004 e Campos (2009). Além disso, a prolina pode atuar na regulação do pH (MAGGIO et al., 2002), estabilização de estruturas protéicas (SCHOBERT e TSCHESCHE, 1978), depósito energético, componente de cascata de sinalização do estresse (WERNER e FINKELSTEN, 1995) e remoção de radicais livres (SARADHI et al., 1995) através do aumento da atividade e transcrição de enzimas antioxidantes amenizando os danos causados pelo estresse oxidativo (CAMPOS, 2009; CARVALHO, 2009).

4.3 Padronização de metodologias de extração e separação de proteínas

Inicialmente foi necessário aperfeiçoar as metodologias de extração e separação das proteínas para obtenção de géis bi-dimensionais de melhor qualidade para as análises. Dessa forma, diversos reagentes em diferentes concentrações foram testados (dados não mostrados) até obtenção de uma metodologia que garantisse quantidade suficiente de proteína nas amostras e perfil reprodutivo entre os géis, visto que a qualidade das amostras protéicas e a reprodutibilidade dos géis figuram entre os principais problemas em estudos comparativos envolvendo proteomas (MECHIN et al., 2003; WANG et al., 2003; ROSE et al., 2004).

Os principais reagentes empregados na extração, solubilização e separação das proteínas em primeira e segunda dimensão podem ser visualizados na Figura 7.

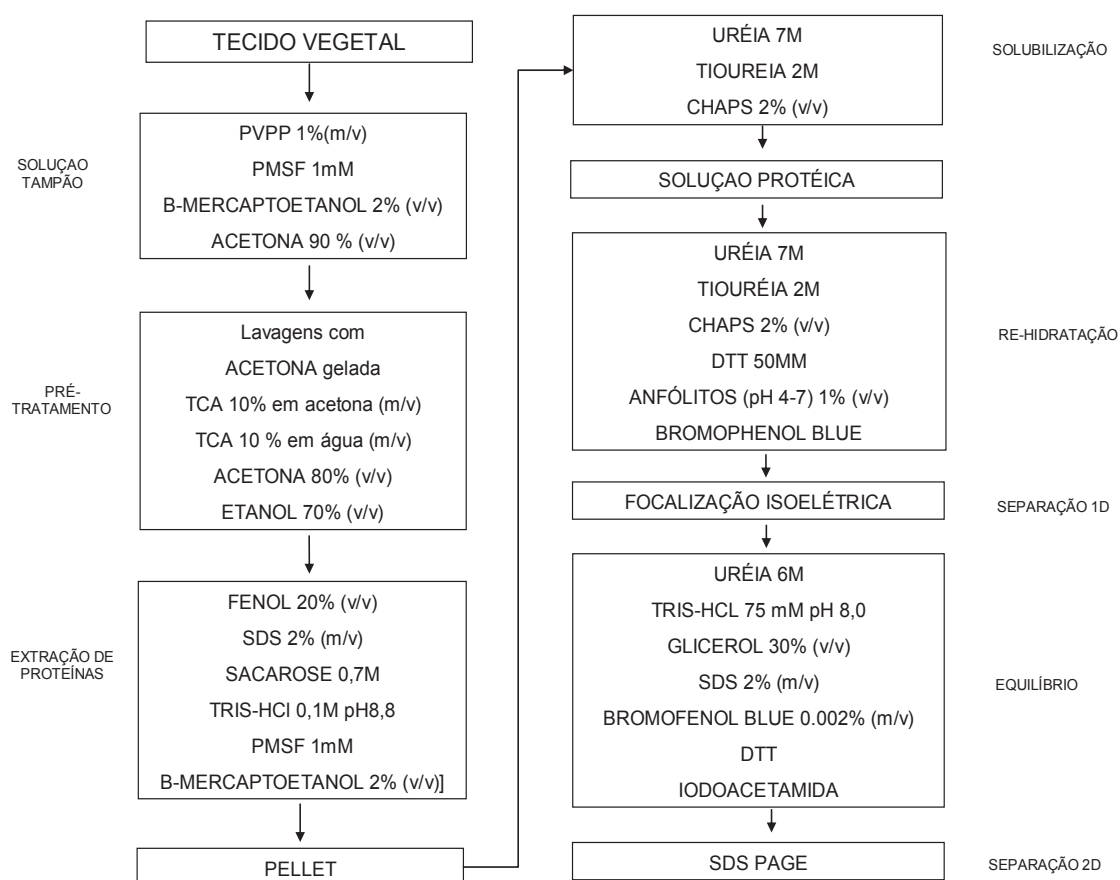


Figura 7 – Principais etapas e reagentes utilizados no preparo e separação das amostras de proteínas

Para o tratamento das amostras de tecido foliar antes do processo de extração, o PVPP (polivinil-pirrolidona) foi utilizado visando remover os compostos interferentes, como por exemplo, os fenólicos que são muito comuns em tecidos vegetais e podem provocar modificações nas proteínas por meio de reações oxidativas (FLENGSRUD e KOBRO, 1989). Mesmo tratando-se de um reagente que pode deixar resíduos na amostra, o mercaptoetanol também foi utilizado com o mesmo propósito antioxidante (MARSHALL e WILLIAMS, 1984), e o PMSF foi empregado como inibidor de proteases, particularmente serino-proteases e algumas cisteino-proteases. Sucessivas lavagens dos tecidos foliares em soluções com acetona gelada, ácido tricloroacético (TCA) e etanol foram também importantes na remoção de interferentes (DNA, RNA, pigmentos, carboidratos etc) e para a precipitação de proteínas das amostras para o processo seguinte de extração com tampão a base de fenol e SDS. O tampão de extração fenol/SDS utilizado e a posterior precipitação das proteínas utilizando 0,1 M acetato de amônio em metanol garantiu amostras de proteínas com menor quantidade de interferentes e géis com spots bem resolvidos.

A solubilização das proteínas obtidas foi realizada em tampão com de uréia, tiouréia e CHAPS. A uréia é um reagente desnaturante que rompe estruturas secundárias das proteínas, expondo completamente seus grupos ionizáveis, que quando utilizada em altas concentrações pode facilitar a solubilização das proteínas. Função semelhante exerce a tiouréia e a eficácia do tampão de solubilização pode ser aumentada utilizando-a em conjunto com a uréia, permitindo maior solubilização de proteínas hidrofóbicas, como as proteínas de membrana (RABILLOUD, 1998). CHAPS é um detergente zwitteriônico, não iônico, que é geralmente empregado para aumentar a solubilização das proteínas, além de prevenir a agregação destas através de interações hidrofóbicas. O tampão de solubilização com estes três reagentes mostrou-se eficiente e possibilitou obtenção de bons rendimentos de proteínas solubilizadas, que foram posteriormente tratadas com DTT (ditiotretol) para clivar as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteína e com IAA (iodoacetamida) para proteger as extremidades protéicas contendo os grupamentos sulfidríla (SH). Na etapa de rehidratação das tiras foram utilizados ainda anfólitos para tamponar a solução e

manter a integridade das faixas de pH imobilizadas no gel de poliacrilamida durante a separação em primeira dimensão (isoeletrofocalização). A separação em segunda dimensão por eletroforese SDS PAGE foi realizada com o tradicional tampão Laemmli (1970), apenas aumentando a concentração dos reagentes Tris, glicina e SDS, o que possibilitou obtenção de spots mais bem resolvidos nos géis.

A separação das proteínas das amostras foi confirmada após a revelação dos spots pelo corante Coomassie Blue G-250. As imagens dos géis evidenciaram que, embora houvesse reprodutibilidade entre os géis, algumas regiões apresentavam menor número de spots ou os apresentavam com resolução prejudicada, principalmente nas extremidades dos géis. Proteínas com pesos moleculares muito altos ou muito baixos, ou com pontos isoelétricos próximos a 4 ou 7 (extremidades das fitas) apresentaram baixa resolução e em alguns casos não foram detectados spots nessas regiões. O exemplo de gel apresentado na Figura 8 permite visualizar o perfil de separação das proteínas expressas pelo tratamento controle irrigado, bem como o problema de resolução dos spots nas extremidades do gel. Dessa forma, os spots detectados pelo programa ImageMaster Platinum 6.0 nestas regiões foram manualmente excluídos em todos os géis e não participaram das análises comparativas.

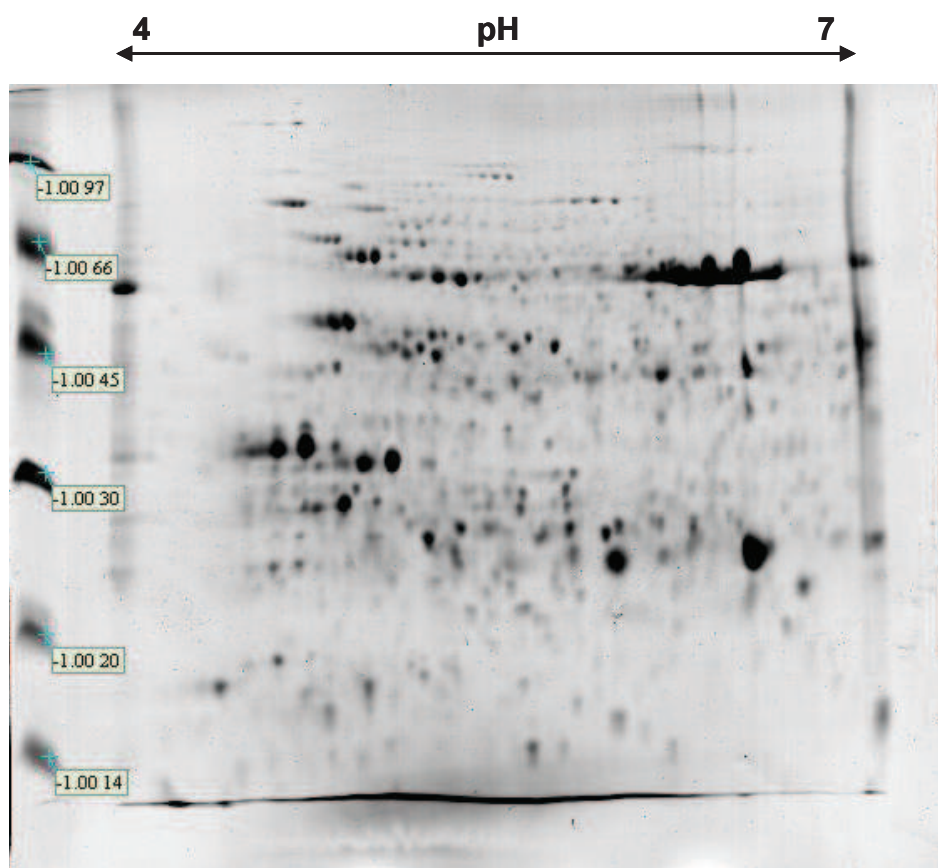


Figura 8 – Exemplo de gel bi-dimensional obtido com amostra de proteínas de folhas do porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ após padronização de metodologia. Focalização isoeletrica em tira IPG de 13 cm pH 4-7 seguindo protocolo de voltagem explicitado na Figura 3. SDS PAGE em concentração 11% e coloração dos géis com Coomassie Blue G-250. À esquerda estão assinalados os marcadores de peso molecular. Imagem obtida a partir do programa de análise ImageMaster Platinum 6.0

4.4. Análises comparativas das imagens dos géis

As comparações entre os tratamentos foram feitas a partir de nove géis de cada tratamento e foram utilizados os mesmos parâmetros de tonalidade, contraste, nitidez e resolução das imagens a serem analisadas no programa ImageMaster Platinum 6.0.

A comparação das imagens dos géis entre os tratamentos exigiu inicialmente selecionar o gel de referência para cada tratamento, designado pelo

programa de análise como gel padrão. Este gel foi escolhido para cada tratamento segundo a quantidade de spots com boa resolução detectados para representar, de forma fiel, o perfil de expressão dos spots do tratamento.

As análises de expressão diferencial entre os tratamentos tiveram como base estes géis de referência, porém com valores de expressão dos spots (volume, área e intensidade) determinados pelos valores dos spots entre os géis das repetições.

4.5 Análise dos spots por espectrometria de massa

4.5.1 Análise dos espectros de massa ms1

Os spots diferencialmente expressos a partir do estudo dos géis com o programa Image Master Platinun 6.0 foram retirados diretamente dos géis e após o adequado tratamento e digestão com tripsina foram submetidos a análise com espectrômetro de massa do tipo MALDI – TOF - TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics). A partir dos espectros de massa ms1 (Figura 9) dos fragmentos trípticos das amostras foi dado início às identificações das proteínas com base no método PMF (Peptide Mass Fingerprinting).

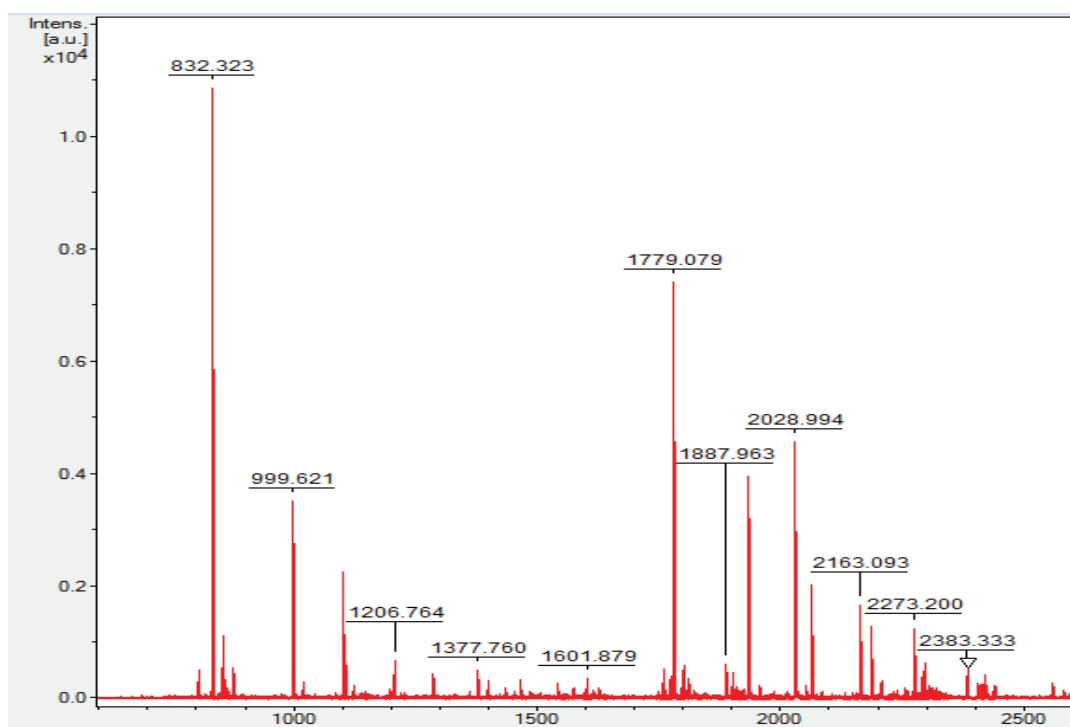


Figura 9 - Espectro de massa ms1 obtido em MALDI TOF-TOF a partir de amostra protéica de citrumelo 'Swingle' digerida com solução enzimática de tripsina.

Os resultados obtidos de intensidade e relação m/z dos íons referentes a cada spot foram compilados em arquivo texto (dta) e utilizados como fonte de entrada para o software de busca. A Figura 10 ilustra a página de pesquisa do Mascot com opção de identificação pelo método PMF, mostrando os parâmetros de pesquisa utilizados nas buscas, tal como o equipamento utilizado (MALDI-TOF-TOF), o banco de dados confrontado (NCBI), e a enzima utilizada na digestão das amostras, neste caso a tripsina. Como modificação fixa assinalou-se a carbamidometilação das cisteínas e como modificação variável a oxidação da metionina.

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name	Diogo Maciel de Magalhaes	Email	diogolbi@gmail.com
Search title	amostra 40		
Database	NCBI nr		
Taxonomy	... Viridiplantae (Green Plants)		
Enzyme	Trypsin	Allow up to	1 missed cleavages
Fixed modifications	Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C) Cation:Na (C-term) Cation:Na (DE) Deamidated (NQ)		
Variable modifications	NIPCAM (C) Oxidation (HW) Oxidation (M) Phospho (ST) Phospho (Y)		
Protein mass		Peptide tol. ±	80 ppm
Mass values	<input checked="" type="radio"/> MH ⁺ <input type="radio"/> M _r <input type="radio"/> M-H ⁻		
Decoy	<input type="checkbox"/>		
Report top	AUTO hits		
Start Search ...	Reset Form		

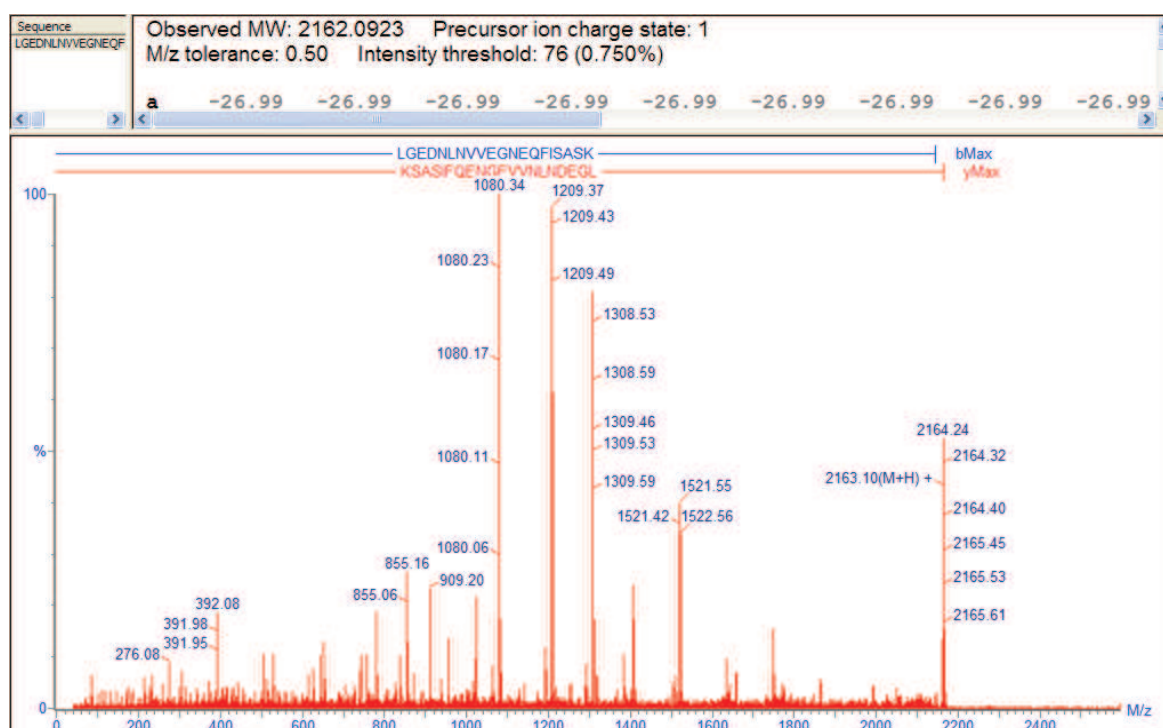
Data file	Procurar...
Query	1958.032 308.48
NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.	2029.017 11601.81
	2062.145 1949.43
	2163.124 2599.43
	2185.127 1123.44
	2273.234 1241.62

Figura 10 - Página da web de acesso ao Mascot com a opção PMF. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados nas buscas realizadas com os dados obtidos por MALDI – TOF – TOF.

Foi selecionado o banco Viridiplantae (Green Plants) para comparação por armazenar sequências mais próximas taxonomicamente às amostras. Os dados estatísticos utilizados no Mascot são baseados em algoritmos Mowse Score (Pappin, 1993), no qual os resultados são expressos a partir de um ponto P em um gráfico de probabilidades. Os resultados obtidos representam as proteínas com sequências peptídicas de maior homologia e com probabilidade menor que 5% de se tratar de algum evento randômico.

As análises dos espectros ms1 mostraram alguns picos similares entre as diferentes amostras de diferentes proteínas. Estes picos podem ser atribuídos a uma possível contaminação das amostras durante a manipulação dos spots, como pela presença de queratina ou algum outro contaminante nas soluções utilizadas no processo de tratamento e clivagem dos spots. Entretanto, análise mais detalhada desses picos idênticos mostrou que estes eram originados de fragmentos peptídicos típicos de auto-clivagem da tripsina. O fato foi

confirmado pelo isolamento e fragmentação de alguns desses peptídeos e posterior sequenciamento manual dos fragmentos, auxiliado pelo programa PepSeq, que mostraram alta similaridade com sequências da proteína tripsina em buscas efetuadas dentro do banco NCBI (Figura 11).



>[pdb|1HJ9|A](#) **S** Chain A, Atomic Resolution Structures Of Trypsin Provide Insight Into Structural Radiation Damage
 Length=223

Score = 61.7 bits (138), Expect = 7e-09

Identities = 19/20 (95%), Positives = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Query 1 LGEDNLNVVEGNEQFISASK 20

LGEDN+NVVEGNEQFISASK

Sbjct 50 LGEDNLNVVEGNEQFISASK 69

Figura 11 - Espectro de massa ms2 obtido pela fragmentação do íon 2163 e posterior sequenciamento manual auxiliado pelo programa PepSeq. Os dados abaixo do espectro referem-se à pesquisa por similaridade da sequência obtida mostrando homologia com a enzima tripsina no banco NCBI.

Após a confirmação das massas relacionadas à autólise de enzima tripsina, os espectros foram filtrados descartando-se estas massas das análises dos espectros ms1 das amostras.

As massas moleculares (MM) e os pontos isoelétricos (pI) das proteínas apontadas como resultados positivos de identificação sugeridos pelo Mascot foram comparados com as informações de MM e pI dos spots correlatos nos géis 2D experimentais. Diferenças entre os valores teóricos e experimentais de até 30% foram aceitas para confirmar a identidade das proteínas. Dessa forma, de 25 spots selecionados no Mascot com positividade quanto à identificação da proteína pelo método PMF (Figura 12), 11 foram confirmados após as respectivas comparações de MM e pI.

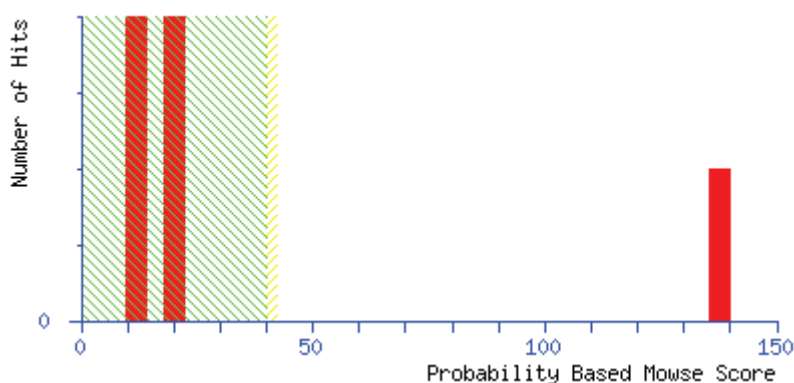


Figura 12 - Site do Mascot mostrando gráfico de probabilidade de identificação de proteína conforme algoritmos Mowse Score. Por este gráfico, os resultados com P maior que 40 indicam peptídeos com homologia significativa e P maior que 42 refere-se à identidade ou extensa homologia ($p < 0,05$).

4.5.2 Análise dos espectros ms2

Íons presentes nos espectros ms1 das amostras dos spots e não relacionados com fragmentos típicos de autólise de tripsina foram selecionados para fragmentação. Os espectros ms2 gerados possibilitaram a identificação de proteínas por outras duas estratégias: 1) *ms/ms ion search* e 2) sequenciamento manual com posterior busca por similaridade dentro do banco NCBI.

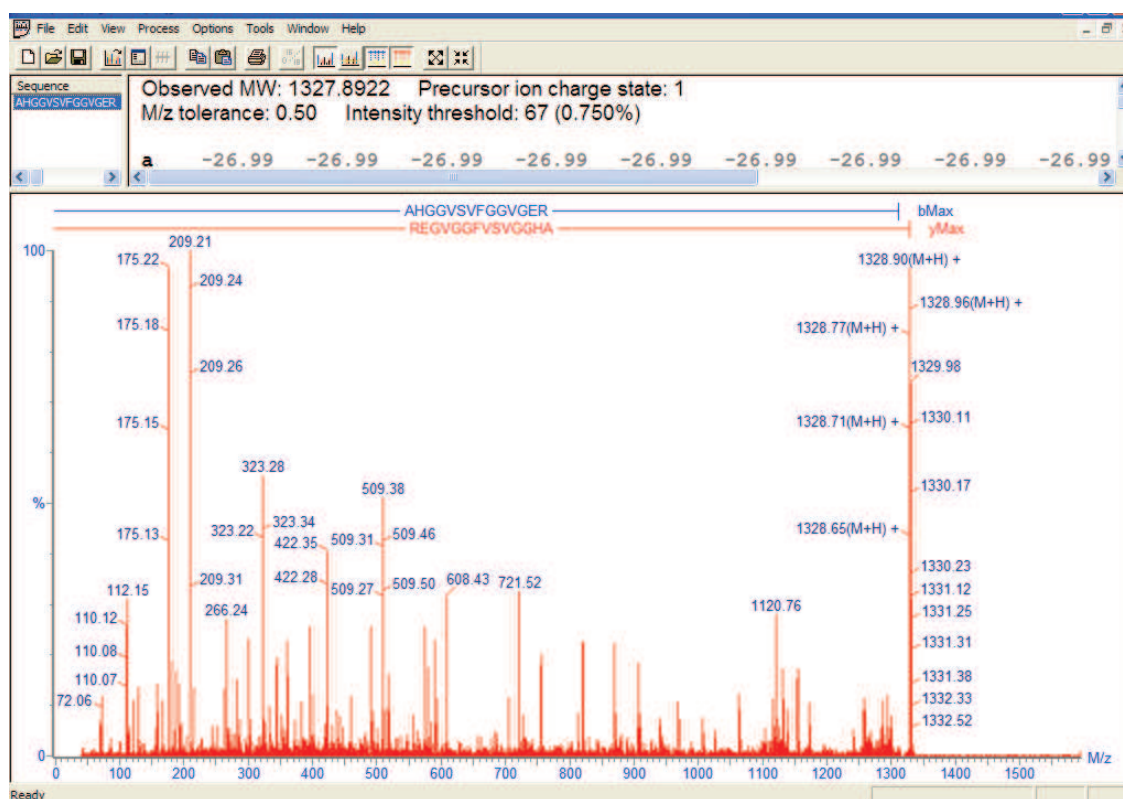
A estratégia ms/ms ion search funciona basicamente da mesma forma que estratégia de identificação por PMF. A plataforma de buscas também foi a do Mascot, porém escolhendo-se a opção *ms/ms ion search* na página inicial do site. Os parâmetros utilizados foram basicamente os mesmos do método PMF, porém nas análises de espectros ms2 foi necessário informar também qual a massa do íon parental selecionado no espectro ms1 que foi fragmentado (Figura 13).

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name <input type="text" value="diogo"/>		Email <input type="text" value="diogolbi@gmail.com"/>	
Search title <input type="text" value="ion 1883"/>			
Database <input type="text" value="NCBIInr"/>			
Taxonomy <input type="text" value="... Viridiplantae (Green Plants)"/>			
Enzyme <input type="text" value="Trypsin"/>		Allow up to <input type="text" value="1"/> missed cleavages	
Fixed modifications <input type="text" value="Biotin (K)"/> <input type="text" value="Biotin (N-term)"/> <input checked="" type="text" value="Carbamidomethyl (C)"/> <input type="text" value="Carbamyl (K)"/> <input type="text" value="Carbamyl (N-term)"/>		Variable modifications <input type="text" value="NIPCAM (C)"/> <input type="text" value="Oxidation (HW)"/> <input checked="" type="text" value="Oxidation (M)"/> <input type="text" value="Phospho (ST)"/> <input type="text" value="Phospho (Y)"/>	
Quantitation <input type="text" value="None"/>			
Peptide tol. \pm <input type="text" value="1.2"/> Da		MS/MS tol. \pm <input type="text" value="0.6"/> Da	
Peptide charge <input type="text" value="1+"/>		Monoisotopic <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>	
Data file <input type="text" value="C:\Documents and Settings\Ad"/> <input type="button" value="Procurar..."/>			
Data format <input type="text" value="Bruker (.XML)"/>		Precursor <input type="text" value="1883"/> m/z	
Instrument <input type="text" value="MALDI-TOF-TOF"/>		Error tolerant <input type="checkbox"/>	
Decoy <input type="checkbox"/>		Report top <input type="text" value="AUTO"/> hits	
<input type="button" value="Start Search ..."/>		<input type="button" value="Reset Form"/>	

Figura 13 - Página da web de acesso ao Mascot com a opção MS/MS íon search. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados nas buscas realizadas com os dados obtidos por MALDI – TOF – TOF. O íon fragmentado neste caso é o de m/z 1883.

Pela estratégia de seqüenciamento manual (sequenciamento *de novo*), as massas geradas por fragmentação são analisadas e segundo análises complexas das séries b e Y obtidas pela fragmentação, os valores das massas são analisados segundo a tolerância de erro do equipamento e relacionadas com massas de aminoácidos. A Figura 14 mostra um exemplo de espectro de massa ms2 obtido pela fragmentação do íon 1328 referente ao spot 19 que após seqüenciamento manual e posterior busca no banco de proteínas do NCBI apontou grande homologia com a proteína ATP sintase (subunidade β) de *Citrus macroptera*.



>[gb|ACJ38536.1](#) ATP synthase subunit B [*Citrus macroptera*]

Length=461

Score = 44.3 bits (97), Expect = 0.001

Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)

Query 1 AHGGVSVFGGVGER 14

AHGGVSVFGGVGER

Sbjct 175 AHGGVSVFGGVGER 188

Figura 14 - Espectro de massas obtido a partir da fragmentação do íon de massa/carga 1328 em MALDI – TOF – TOF com seqüenciamento manual no programa PepSeq. Comparação no banco NCBI apontou alto grau de similaridade com a proteína ATP synthase subunit B de *Citrus macroptera*

4.6.1 Análise comparativa de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e submetidas ao déficit hídrico (CE)

A comparação dos géis de proteínas obtidas de plantas controle irrigadas (CI) e sob déficit hídrico (CE) permitiu analisar a expressão diferencial dos spots em plantas não transgênicas em função do estresse. Foi possível identificar 26 spots diferencialmente expressos, dos quais 7 tiveram suas proteínas identificadas após análises dos espectros de massa em MALDI-TOF-TOF e buscas pelo Mascot (Figura 15).

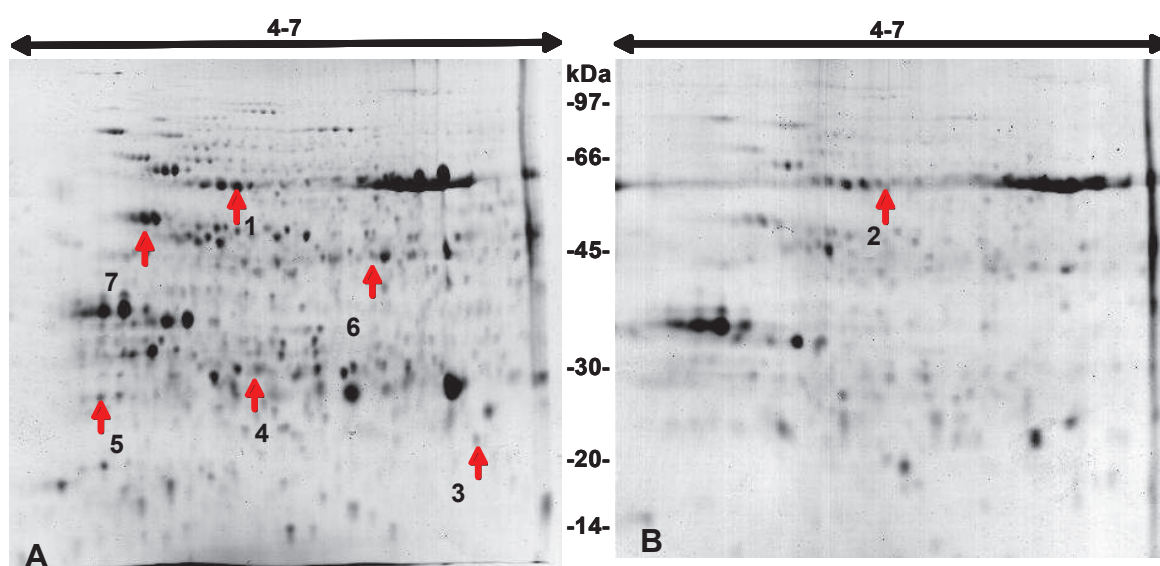


Figura 15 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo 'Swingle'. A - Controle irrigado (CI). B - Controle estressado (CE). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 4 – 7. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. Seta para cima indica maior expressão e seta para baixo indica menor expressão.

Das sete proteínas identificadas pela comparação entre os tratamentos CI e CE, 6 foram identificadas por PMF (Tabela 2) e 1 foi identificada a partir do seqüenciamento manual e posterior busca no banco de proteínas do NCBI (Tabela 3).

Tabela 2 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e submetidas ao déficit hídrico (CE) através de PMF. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot. A expressão qualitativa é indicada pelos sinais + (presença) e – (ausência) de forma isolada. Os valores na coluna de expressão representam as diferenças quantitativas, indicando aumento (+) ou repressão (-) de expressão entre os tratamentos.

Proteína	Spot	Cobertura (%)	MM/pl teórico	MM/pl experimental	Homologia	NCBI (acesso)	Expressão	
							CI	CE
ATP sintase subunidade β	1	58	50.7/ 5.1	55/ 5.0	<i>Eremocitrus glauca</i>	AAD11732	+1,5	-1,5
taxane 2- α -O-benzoiltransferase	2	21	50.5/ 6.2	60/ 5.7	<i>Taxus x media</i>	AAT79354	-	+
Proteína de ligação a clorofila a/b	3	37	14.4/ 7.7	20/ 6.8	<i>Solanum tuberosum</i>	AAA80595	+	-
Proteína de ligação ao RNA rica em glicina	4	37	16.3/ 5.6	26/ 5.5	<i>Brassica napus</i>	CAA78513	+	-
Álcool desidrogenase	5	29	33.5/ 2.2	29/ 4.1	<i>Miscanthus sinensis var. condensatus</i>	CAD56711	+	-
Promotor de crescimento independente de auxina	6	43	73.4/ 6.7	48/ 6.0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF00637	+	-

Tabela 3 - Identificação de proteína com expressão diferencial devido ao déficit hídrico em plantas de citrumelo 'Swingle' (irrigado - CI x estressado - CE). Através de seqüenciamento. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no NCBI. A expressão qualitativa é indicada pelos sinais + (presença) e – (ausência) de forma isolada. Os valores na coluna de expressão representam as diferenças quantitativas, indicando aumento (+) ou repressão (-) de expressão entre os tratamentos.

Proteína	Spot	Íon parental	Score	Seqüência	Homologia	NCBI (acesso)	Expressão	
							CI	CE
Rubisco ativase	7	1883	138	K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A	<i>Populus euphratica</i>	P84562	+1.6	-1.6

As análises das proteínas identificadas com expressão diferencial entre os tratamentos controle irrigado (CI) e controle estressado (CE) permitiu constatar que a proteína taxane 2- α -O-benzoiltransferase foi expressa apenas na situação de estresse (CE).

4.6.1.1 ATP SINTASE SUB-UNIDADE β

ATP sintases estão envolvidas com a síntese de moléculas de ATP a partir de ADP em diferentes processos metabólicos, principalmente na fotossíntese durante a assimilação de carbono no ciclo de Calvin. Participam de processos de fosforilação oxidativa e fotofosforilação.

O estresse oxidativo causa graves danos nas subunidades alfa e beta da enzima ATP sintase, com diminuição na abundância destas em mitocôndrias de plantas (SWEETLOVE et al., 2002). Entretanto, Jiang et al. (2008) observaram aumento na expressão destas subunidades alfa e beta em trigo (*Triticum aestivum* L.) estressados por necrose em suas folhas.

Neste trabalho, a ausência de expressão da sub-unidade β da enzima ATP sintase nas plantas submetidas a condições de seca pode indicar danos consideráveis na enzima causado pelo estresse oxidativo resultante do déficit hídrico, o que prejudica as reações químicas que utilizam energia de moléculas de ATP provenientes principalmente desta enzima (ZHANG et al., 2009).

4.6.1.2 TAXANE 2- α -O-BENZOILTRANSFERASE (TBT)

Identificada inicialmente em espécies da família Taxacea, TBT pertence a uma classe enzimática que tem atividade acetil transferase na biossíntese de taxol (paclitaxel), um diterpenóide muito utilizado como efetivo

quimioterápico no tratamento do câncer, onde atua como potente inibidor mitótico (GOLDSPIEL, 1997; TAKIMOTO, 2008).

A enzima TBT (EC 2.3.1.166) pertence a um grupo de acetiltransferases denominado BAHD, sigla referente a primeira letra do nome das 4 enzimas bioquimicamente caracterizadas dessa família. O grupo inclui as enzimas BEAT (Benzilalcool O-acetiltransferase), AHCT (Antocianina O-hidroxicinamoil transferase), HCBT (Antranilato N-hidroxicinamoil/benzoil transferase) e DAT (Deacetilvindoline 4-O-acetil transferase) (D'AURIA, 2006).

Enzimas BAHD catalisam a síntese de fitoalexinas, metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta a estresses. Existem mais de 300 tipos caracterizados entre as diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos e flavonóides (CAVALCANTI et al., 2005; MAZARO et al., 2008).

Esta foi a única proteína identificada com aumento de expressão nas plantas de citrumelo 'Swingle' não transformadas após submissão ao déficit hídrico. Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados devido ao estresse hídrico e, conseqüentemente, podem levar a alterações no metabolismo secundário. O efeito da seca na concentração dos metabólitos é, geralmente, dependente do grau de estresse e do período em que ocorre, sendo que efeitos em curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto que em longo prazo é observado o efeito oposto (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Neste trabalho, a identificação de enzima similar a TBT pode se relacionar com a síntese de metabólitos secundários e, como foi encontrada apenas nas plantas estressadas, possivelmente o estresse percebido desencadeou a síntese desses metabólitos para regulação de mecanismos de respostas de defesa contra estresses.

4.6.1.3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A CLOROFILA a/b

Grande parte das clorofilas das células vegetais está envolvida com a absorção da energia luminosa e transferência para os centros de reação fotoquímica. Estas clorofilas antena são não-covalentemente ligadas a proteínas específicas para formar complexos clorofila-proteína. As proteínas de ligação às clorofila a /b (CAB) são codificadas por uma grande família de genes nucleares, que após serem sintetizadas pelos ribossomos são direcionadas para as membranas dos tilacóides (GREEN et al., 1991).

Um dos primeiros e mais conhecidos complexos protéicos de ligação a clorofila é o LHCII (Light-Harvesting complex of photosystem II), que representa quase metade desses complexos de ligação e é particularmente importante pelo seu envolvimento na capacidade de adaptação das plantas a curtos e longos períodos de intensidade luminosa e temperatura (ANDERSON e ANDERSON, 1988). Bassi et al. (1997) observaram maior expressão em subunidades de LHCII, relacionando estas proteínas a mecanismos de tolerância a estresse. Em trabalhos com *Arabidopsis*, Johnson et al. (2007) observaram que elevados níveis de zeaxantina na fração oligomérica de LHCII protegeram as plantas contra danos causados por estresse oxidativo, como peroxidação de lipídeos e fotoinibição de clorofilas. LHCII pode atuar como dissipador do excesso de energia de excitação durante estresse térmico e dessa forma pode representar um mecanismo de tolerância das plantas (TANG et al., 2007).

Em condição de déficit hídrico, como estresse por baixas temperaturas, Atienza et al. (2004) observaram menor expressão em genes que codificam para proteínas do LHCII. Neste trabalho, as proteínas LHCII foram detectadas apenas nos porta-enxertos controle em situação irrigada, ao passo que em condição de déficit hídrico estas não foram detectadas. Possivelmente o nível de estresse atribuído contribuiu para danos no processo fotossintético causando menor taxa energética disponível (PURSIHEIMO et al., 2001), o que justificaria uma menor expressão destas proteínas, porém, a não detecção da proteína em situação de estresse pode estar relacionada a atividade de proteases

específicas atuando na degradação destas proteínas como um mecanismo de tolerância das plantas.

4.6.1.4 PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO RNA RICA EM GLICINA

A família de proteínas ricas em glicina corresponde a um grande e complexo grupo de proteínas vegetais que compartilham, como característica comum, a presença de domínios ricos em glicina dispostos em repetições (Gly)_n-X. Com base na sua estrutura primária e domínio funcional, as proteínas ricas em glicina podem ser classificadas em quatro grandes grupos dentre os quais estão presentes as proteínas de ligação ao RNA ricas em glicina (FUSARO e SACHETTO-MARTINS, 2007).

O controle da expressão gênica em plantas superiores ocorre em diferentes níveis incluindo a maturação do pré-RNA mensageiro, o seu transporte, tradução e degradação (SCHONING et al., 2008). Os principais atuantes no processo são as proteínas de ligação ao RNA que influenciam o destino de uma molécula de mRNA, quer diretamente através da ligação a sequências definidas de RNA e elementos estruturais ou indiretamente através de interações proteína-proteína (LORKOVIC e BARTA, 2002).

Estas proteínas de ligação ao RNA ricas em glicina que contém um ou mais motivos de reconhecimento de RNA na porção N-terminal e uma região rica em glicina na porção carboxi terminal foram identificadas em diferentes espécies de plantas. Embora a sua função ainda não tenha sido bem caracterizada, foi sugerido que algumas possuem importante papel na resposta a estresses uma vez que seus níveis de RNA mensageiro se elevam em exposição ao frio, ferimento, estresse hídrico, hormônio e infecção viral (KIM et al., 2008).

Diversos estudos confirmam a atuação destas proteínas em diferentes condições ambientais desfavoráveis (KWAK et al., 2005; KIM e KANG, 2006; CAO et al., 2006). Contudo, em condição de deficiência hídrica utilizada no presente estudo uma das proteínas de ligação ao RNA ricas em glicina teve sua

expressão reduzida durante o estresse aplicado. É importante ressaltar que os trabalhos relatados enfocaram a resposta de plantas ao frio como condição à elevação nos níveis destas proteínas, sendo que poucos estudos abordam o déficit hídrico na expressão de proteínas de ligação ao RNA ricas em glicina (KIM et al., 2008). Também, diferentes isoformas dessa família de proteínas podem responder diferencialmente tanto para diferentes estresses como para a intensidade dos mesmos.

4.6.1.5 ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)

É uma proteína altamente expressa sob condições de hipóxia/anóxia. Sua atividade é crítica para a reciclagem de NADH e para a continuação da via glicolítica (KUMUTHA et al., 2008). Os membros deste grupo pertencem à superfamília protéica das desidrogenases/redutases de cadeia média. Dois tipos de álcool desidrogenase têm sido identificados, álcool desidrogenases clássicas, de cadeia longa (chamadas classe P em plantas), e álcool desidrogenases de cadeia curta (CHARLESWORTH et al, 1998). Em plantas as ADHs são de cadeia longa, requerem zinco como co-fator, possuem aproximadamente 310 resíduos de aminoácidos e são diméricas (YOKOYAMA et al., 1990). Embora as seqüências protéicas de álcool desidrogenases sejam altamente conservadas, sua função metabólica é bastante variável (CHARLESWORTH et al., 1998).

Clegg et al. (1997) verificou que a transcrição destes genes aumentou em condições de falta de oxigênio e baixas temperaturas em milho e *Arabidopsis*. Estudo realizado com a halófita *Thellungiella salsuginea* evidenciou que transcritos de *ADH* foram diferencialmente expressos em condições de alta salinidade, baixas temperaturas e deficiência hídrica (WONG et al., 2006). De acordo com Kumar et al. (2007) plantas de *Nicotiana benthamiana* com um gene *ADH* inativo e submetidas a déficit hídrico demonstraram uma menor concentração de clorofila, o que não ocorreu em plantas bem hidratadas. Também, plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresses abióticos

mostraram altos níveis transcricionais do gene *ADH1*, refletindo na elevada atividade da enzima álcool desidrogenase (PAPDI et al., 2008).

Embora estudos anteriores apontem a expressão da enzima álcool desidrogenase como importante para a tolerância a diversos estresses ambientais, no presente trabalho a ADH foi identificada na condição irrigada de plantas não transformadas. Em situação de déficit hídrico esta enzima não foi detectada indicando que neste caso a ADH não participou da resposta de tolerância ao estresse em citrumelo 'Swingle'. Os resultados deste trabalho indicam que o papel da enzima álcool desidrogenase na tolerância à seca ainda não está claro, sendo necessários mais estudos em diferentes modelos para verificar a regulação desta enzima tanto em níveis transcricionais, traducionais e atividade em diferentes tecidos durante estresses abióticos (KUMAR et al., 2007).

4.6.1.6 RUBISCO ATIVASE

A enzima rubisco ativase está intimamente relacionada com a síntese da principal enzima envolvida no processo fotossintético, a Rubisco (ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase). A rubisco ativase promove a ativação da rubisco por facilitar a dissociação dos açúcares fosfato tanto por descarbamilar sítios contendo RuBP ou análogos de RuBP, quanto por carbamilar sítios contendo análogos de RuBP (PORTIS et al., 2007).

Períodos de estresse hídrico acarretam redução na condução estomática e subsequente queda nos níveis de CO₂. Os baixos níveis de CO₂ nos estromas levam a inativação da atividade carboxilase da Rubisco pela ligação com açúcares nos sítios ativos (PARKER et al., 2006). A quantidade de Rubisco nas folhas é controlada pela taxa de síntese e degradação da enzima, mesmo sob estresse ambiental. Perdas da atividade da Rubisco tem sido reportadas em algumas plantas sob deficiência hídrica, nas quais se verificam também um declínio na atividade da enzima Rubisco ativase (CHAVES et al., 2003).

Por ter sua regulação estreitamente ligada aos níveis fotossintéticos das plantas, a menor expressão da enzima nas plantas de citrumelo 'Swingle' estressadas pode ser explicada pela diminuição da fotossintética devido ao estresse. Também, é possível inferir que a menor quantidade de rubisco ativase seja devido à proteases atuando sobre essas enzimas para utilizar produtos da degradação para a síntese de compostos de maior importância frente à situação de estresse. A degradação de proteínas também possibilita maior estoque de N e C para ser usado durante o estresse ou num momento posterior de recuperação (JIANG et al., 2007).

4.6.1.7 PROMOTOR DE CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE AUXINA

A auxina é um fitormônio que desencadeia importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, atuando, por exemplo, no estímulo ao desenvolvimento de gemas apicais, de frutos e aceleração da floração (DAVIES, 1989). Estudos bioquímicos revelam que existem diversas proteínas que se ligam as auxinas e atuam como receptores e iniciadores de transdução de sinais (GOLDSMITH, 1993).

A proteína promotora de crescimento independente de auxina detectada em menor quantidade após o período de estresse nas plantas não transgênicas de citrumelo 'Swingle' possui o domínio conservado DUF 246, que a enquadra numa superfamília de proteínas com função desconhecida, apenas sendo relatada como envolvida na regulação de crescimento de plantas independente de auxina. A seca é um estresse que afeta as plantas em diversos níveis de organização, por exemplo o crescimento e produtividade (PASSIOURA, 1997), que são dependentes do balanço de taxas fotossintéticas e respiratórias (FLEXAS et al., 2006). Desta forma, o estresse imposto pela seca altera a expressão de genes envolvidos no crescimento e respostas fisiológicas de tolerância, sendo os promotores de crescimento independente de auxina um possível exemplo que, na condição de déficit hídrico utilizada neste trabalho se mostraram ausentes na condição de déficit hídrico nas plantas controle

4.6.2 Análise comparativa de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' transgênicas irrigadas (TI) e submetidas ao déficit hídrico (TE)

A comparação dos géis de proteínas obtidas de plantas transgênicas irrigadas (TI) e sob déficit hídrico (TE) permitiu analisar a expressão diferencial dos spots nas plantas com alto acúmulo de prolina em função do estresse hídrico a que foram submetidas. Foi possível identificar 21 spots diferencialmente expressos, dos quais 6 tiveram suas proteínas identificadas após análises dos espectros de massa em MALDI-TOF-TOF e buscas pelo Mascot (Figura 16).

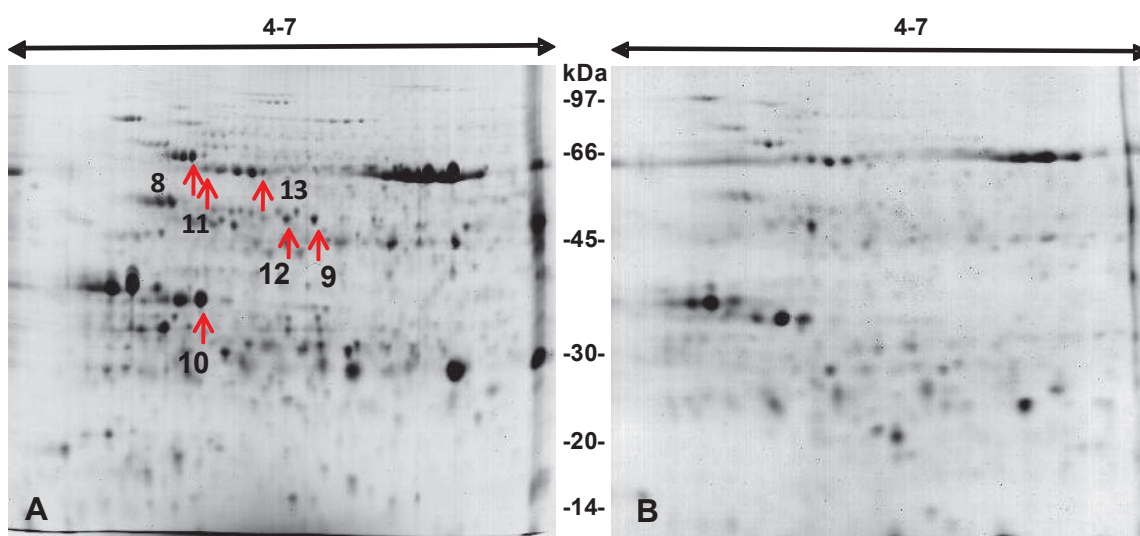


Figura 16 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo 'Swingle'. A – Transgênico irrigado (TI). B - Transgênico estressado (TE). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 4 – 7. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. Seta para cima indica maior expressão e seta para baixo indica menor expressão.

Tabela 4 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' transgênicas irrigadas (TI) e submetidas ao déficit hídrico (TE) através de PMF. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot. A expressão qualitativa é indicada pelos sinais + (presença) e – (ausência) de forma isolada. Os valores na coluna de expressão representam as diferenças quantitativas, indicando aumento (+) ou repressão (-) de expressão entre os tratamentos.

Proteína	Spot	Cobertura (%)	MM/pl teórico	MM/pl experimental	Homologia	NCBI (acesso)	Expressão	
							TI	TE
ATP sintase sub-unidade β	8	47	50.7/ 5.3	55/ 5.1	<i>Eremocitrus glauca</i>	AAD11732	+	-
Receptor de etileno	9	30	41.6/ 5.0	45/ 5.3	<i>Malus x domestica</i>	AAX18339	+	-
Complexo de evolução do oxigênio	10	34	26.6/ 5.1	30/ 5.0	<i>Oryza sativa</i>	2002393A	+5.9	-5.9

Tabela 5 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' transgênicas irrigadas (TI) e submetidas ao déficit hídrico (TE) através de sequenciamento. Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot. A expressão qualitativa é indicada pelos sinais + (presença) e – (ausência) de forma isolada. Os valores na coluna de expressão representam as diferenças quantitativas, indicando aumento (+) ou repressão (-) de expressão entre os tratamentos.

Proteína	Spot	Íon parental	Score	Seqüência	Homologia	NCBI (acesso)	Expressão	
							TI	TE
ATP sintase sub-unidade α	11	1416	103	R.IAQIPVSESFLGR.V	<i>Schizaea dichotoma</i>	YP_740460	+	-
Fosfoglicerato quinase	12	2028	52.4	WINVPLDDNQNITDDTR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001117503	+	-
ATP sintase sub-unidade β	13	2125	69.8	GMEVIDTGAPLSVPVGGVTLGR	<i>Citrus macroptera</i>	ABM74441	+	-

4.6.2.1 ATP SINTASE SUBUNIDADES α E β

Como observado na comparação entre as plantas controle irrigadas e estressadas, os resultados obtidos ao se contrastar as plantas transgênicas nestas mesmas condições hídricas também evidenciaram que durante a deficiência de água, a proteína ATP sintase subunidade β não foi detectada. Além disso, a subunidade α também não estava presente nas plantas contendo o transgene *P5CSF129A* submetidas à seca.

4.6.2.2 RECEPTOR DE ETILENO

Etileno é um hormônio vegetal gasoso envolvido em diversos processos como germinação, senescência amadurecimento dos frutos, abscisão foliar, morte celular programada, e abertura estomática (DESIKAN et al., 2006). Além disso, reações de plantas frente a estresses bióticos e abióticos também envolvem a ação do etileno (GREFEN et al., 2008). Uma vasta gama de estresses abióticos incluindo inundações, seca, alta e baixa temperatura, metais e sal podem induzir a síntese de etileno por estresse.

O etileno é percebido através de uma família de receptores associados à membrana (GUO e ECKER, 2004). Cada receptor de etileno possui uma estrutura global semelhante, com domínios transmembrana contendo sítios de ligação ao etileno na porção N-terminal seguido por um domínio GAF de função desconhecida, e domínios de sinal de saída na metade C-terminal (HALL et al., 2007). Embora similares, os receptores de etileno podem ser subdivididos em duas sub-famílias baseando-se em análises filogenéticas e características estruturais compartilhadas. A subfamília 1 inclui ETR1 e ERS1 e a subfamília 2 inclui os receptores ETR2, ERS2 e EIN4 (CHANG e STADLER, 2001).

Receptores de etileno servem como reguladores negativos das vias de transdução de sinal. Assim, uma diminuição nos níveis de receptores deve sensibilizar a planta de tal modo que responda a baixos níveis de etileno fora do

habitual. Se os receptores são reduzidos em número suficiente, a resposta deve ocorrer mesmo com pouco estímulo (ZHAO et al., 2004). Neste trabalho, a presença de uma proteína receptora de etileno foi verificada apenas nas plantas transgênicas irrigadas, enquanto que em situação de estresse não houve detecção, indicando uma possível atuação do alto acúmulo de prolina sob a expressão destes receptores quando as plantas atingiram determinados níveis de estresse. Uma hipótese a ser estudada é que as plantas estressadas possivelmente responderam mais rapidamente ao estímulo de etileno devido à diminuição do número de receptores, e consequentemente, aos efeitos do estresse.

4.6.2.3 PROTEÍNA DO COMPLEXO DE EVOLUÇÃO DO OXIGÊNIO (OXYGEN INVOLVING COMPLEX PROTEINS - OEC)

O fotossistema II (PSII) é um complexo de multisubunidades de proteínas e pigmentos contendo polipeptídios intrínsecos e extrínsecos à membrana fotossintética do cloroplasto (KAMIYA e SHEN, 2003; RAYMOND e BLANKENSHIP, 2004). No núcleo central do complexo, pigmentos clorofila e beta caroteno estão acoplados principalmente às proteínas do complexo antena CP43 (PsbC) e CP47 (PsbB), que passam a excitação da energia luminosa para as proteínas do centro de reação D1 (Qb, PsbA) e D2 (Qa, PsbD), que englobam todos os cofatores envolvidos no processo de conversão energética. OEC do PSII é responsável pela oxidação de moléculas de água em presença da luz (fotooxidação) e no processo libera, além do oxigênio molecular, prótons e elétrons necessários e de grande importância no processo fotoquímico da fotossíntese. OEC, em plantas, é formado por 3 proteínas extrínsecas OEE1 (PsbO), OEE2 (PsbP) e OEE3 (PsbQ), além de moléculas de cálcio, manganês e íons cloreto (THORNTON et al., 2004).

O déficit hídrico afeta diversos mecanismos do processo fotossintético da planta, incluindo a etapa de fotooxidação (JIANG et al., 2007). Tem sido relatado que as proteínas OEC podem ser o primeiro ponto de inibição

do PSII, prejudicando o suprimento de elétrons para a redução da P680 (HAKALA et al., 2005; OHNISHI et al., 2005). Esta redução na expressão durante o déficit hídrico pode estar relacionada a uma estratégia de regulação da síntese ou degradação causada por danos inerentes ao estresse. Também tem sido proposto que uma redução na atividade fotossintética pode ser um mecanismo para diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas fotossinteticamente.

Proteínas OEC têm sido relacionadas a estresse hídrico e geralmente observa-se que, da mesma forma como aconteceu neste trabalho, a expressão destas diminui em plantas em situação de estresse (EASTMAN et al., 1997; COLLETT et al., 2004; INGLE et al., 2007). Zomeno et al. (2009) identificaram duas proteínas precursoras de OEC que tiveram sua expressão reduzida sob condição de déficit hídrico. Aumento na expressão dessas proteínas OEC é observado em outras espécies de plantas em resposta ao déficit hídrico, mostrando que as informações acerca das vias metabólicas envolvidas nos efeitos e nos processos biológicos de defesa da planta frente ao estresse ainda são insuficientes (BLODNER et al., 2007; BOGGEAT-TRIBOULOT et al., 2007).

4.6.2.4 FOSFOGLICERATO QUINASE

A enzima fosfoglicerato quinase está envolvida com a primeira etapa do ciclo de Calvin na assimilação do CO₂ pela fotossíntese, onde utiliza ATP para fosforilar moléculas de 3-fosfoglicerato e produzir 1,3 bifosfoglicerato (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Rabbani et al. (2003) avaliaram o perfil de expressão gênica de arroz (*Oryza sativa* L.) submetido a diferentes tratamentos de estresse, tais como frio, seca, elevada salinidade e aplicação de ABA, observando a indução de vários genes, entre eles o que codifica para a enzima fosfoglicerato quinase. Também em estudos com arroz, Parker et al. (2006) observaram maior expressão desta enzima quando as plantas foram submetidas a estresse salino.

Neste trabalho, a expressão diferencial dessa enzima se deu quando comparadas as plantas transgênicas nas diferentes situações hídricas. A presença da fosfoglicerato quinase detectada apenas nas plantas transgênicas irrigadas mostra que o acúmulo de prolina influenciou nas vias de síntese ou degradação da enzima destas plantas quando submetidas ao déficit hídrico. Esta resposta observada pode estar relacionada a uma maior proteção do sistema fotossintético aliado a redução da atividade metabólica pela presença de altas concentrações de prolina.

4.6.3 Análise comparativa de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e transgênicas irrigadas (TI)

4.6.3.1 Géis bidimensionais 4-7

Essas comparações permitiram analisar a expressão diferencial de proteínas devido ao alto acúmulo de prolina nas folhas causado pela expressão constitutiva do transgene *P5CSF129A*. Foram detectados 8 spots diferencialmente expressos, dos quais 2 tiveram suas proteínas identificadas após análises dos espectros de massa em MALDI-TOF-TOF e buscas pelo Mascot (Figura 17; Tabela 6).

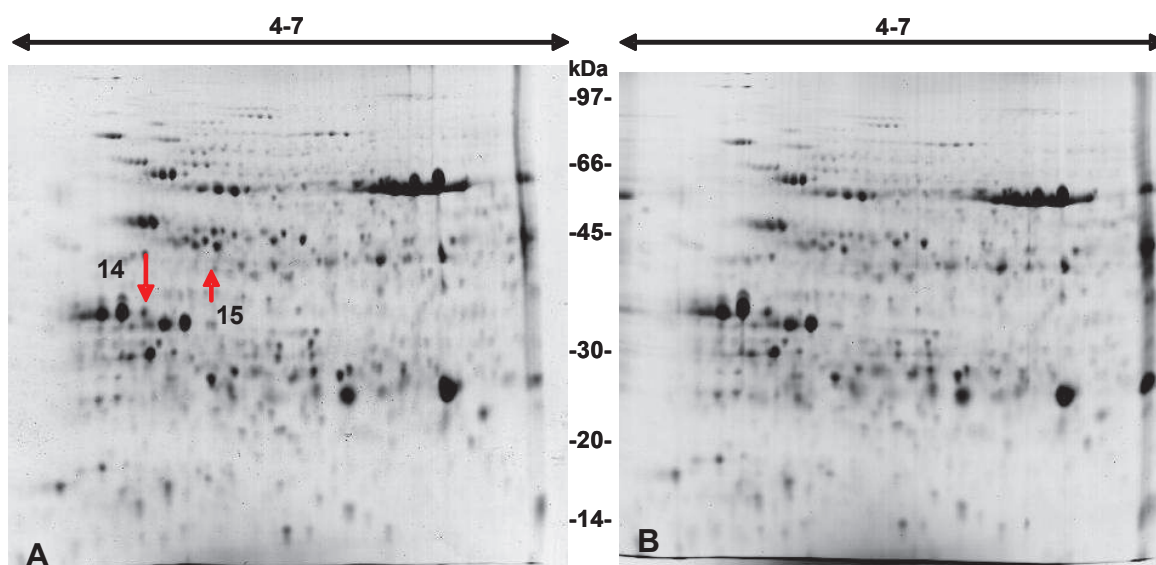


Figura 17 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo 'Swingle'. A - Transgênico irrigado (TI). B - Controle irrigado (CI). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 4 – 7. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. Seta para cima indica maior expressão e seta para baixo indica menor expressão.

Tabela 6 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e transgênicas irrigadas (TI) através de PMF (gel 2D pH 4-7). Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot. A expressão qualitativa é indicada pelos sinais + (presença) e – (ausência) de forma isolada. Os valores na coluna de expressão representam as diferenças quantitativas, indicando aumento (+) ou repressão (-) de expressão entre os tratamentos.

Proteína	Spot	Cobertura (%)	MM/pi teórico	MM/pi experimental	Homologia	NCBI (acesso)	Expressão	
							CI	TI
Proteína similar à lectina	14	57	29.3/ 5.1	32/4.8	<i>Citrus x paradisi</i>	AAG38522	+1.6	-1.6
Hemoglobina	15	48	15.6/ 5.9	30/5.5	<i>Medicago sativa</i>	AAA32659	-	+

As análises dos géis permitiram detectar um menor número de spots diferencialmente expressos entre os tratamentos CI e TI (8 spots) do que do que nas comparações entre CI e CE (26 spots). Pelo estresse desencadear um grande número de respostas nas plantas, que são traduzidas em diversos mecanismos metabólicos e bioquímicos mediados por proteínas, era esperado que o perfil proteômico das plantas submetidas ao déficit hídrico tivesse maior modificação do que o perfil proteômico resultante apenas da presença do transgene. A inserção do transgene permite maior acúmulo de prolina, mas esta modificação deve atuar em uma quantidade reduzida de vias metabólicas, alterando a expressão de um menor número de proteínas se comparado com a situação estressante

4.6.3.1.1 PROTEÍNA SIMILAR À LECTINA (LECTIN RELATED PROTEIN)

Lectina é uma designação dada a proteínas ou glicoproteínas que geralmente se ligam a carboidratos sem modificá-los bioquimicamente. Um domínio de reconhecimento de carboidratos pode estar ligado a outras seções funcionais da proteína, por exemplo, outro domínio com atividade enzimática, mas é a presença desta habilidade de ligação de carboidrato distinta numa proteína que justifica chamá-la de lectina (GABIUS et al., 2002; LORIS, 2002).

Lectinas vegetais apresentam alta estabilidade a variações de temperatura e pH e resistem a uma grande variedade de enzimas proteolíticas, característica comum à maioria das proteínas envolvidas com mecanismos de defesa das plantas. Diversas proteínas relatadas como de defesa, por exemplo inibidores de proteases (RYAN, 1990), proteínas fungicidas (BROEKAERT et al., 1992) e inibidores de α -amilase (BOEHLMANN, 1988) sobrevivem em tratamentos que normalmente inativariam proteínas normais não relacionadas a estresses. Questões sobre o papel biológico extrínseco das lectinas de plantas vem sendo investigadas e revisadas, refletindo a potencialidade e diversidade da atividade destas proteínas na defesa da planta. Dentre elas, atividade antifúngica, inseticida, antinutricional e tóxica vem sendo objeto de pesquisa (YAN et al,

2005). Também tem sido observado que a expressão de algumas lectinas de plantas aumenta como consequência a estímulos bióticos ou abióticos como estresse, infecção por vírus, seca ou alta concentração salina (ANTONYUK e EVSEEVA, 2006).

A identificação de proteína similar a lectina sendo menos expressa nas plantas transgênicas em situação normal de suprimento hídrico indica que altos níveis de prolina podem estar relacionados direta ou indiretamente com a degradação desta proteína.

4.6.3.1.2 HEMOGLOBINA

Hemoglobinas são proteínas que se ligam reversivamente ao oxigênio e são encontradas nos cinco reinos taxonômicos em diferentes estruturas assumindo diferentes funções (WEBER e VINOGRADOV, 2001). Embora esteja associada principalmente ao oxigênio, a hemoglobina também pode se ligar ao CO e ao NO, além de várias outras moléculas orgânicas como fosfolípidos e outros lípidos de membrana (BONAMORE et al., 2003; RINALDI et al., 2006).

A primeira hemoglobina de plantas foi isolada de nódulos de soja (DORDAS, 2009) e hoje existem mais de 66 hemoglobinas identificadas em mais de 46 espécies de plantas (GARROCHO-VILLEGAS et al., 2008). Três diferentes tipos de hemoglobina são sintetizados em plantas: as simbióticas (sHb), as não simbióticas (nsHb) e as truncada (trHb) (HOY e HARGROVE, 2008).

As hemoglobinas de plantas mais bem conhecidas são as sHb e são encontradas apenas em nódulos de plantas capazes de fixar nitrogênio simbiótico, regulando o suprimento de oxigênio para as bactérias fixadoras de nitrogênio (APPLEBY, 1992). Hemoglobinas nsHb apresentam-se em baixas concentrações e não estão envolvidas com a fixação de nitrogênio, sendo encontradas principalmente em raízes, sementes e caules de monocotiledôneas e dicotiledôneas capazes ou não de se associarem por simbiose. As nsHb são

expressas diferencialmente em plantas submetidas a distintos estresses, principalmente em condição ambiental de hipoxia e, dessa forma, tem sido relacionadas com tolerância a estresses em plantas (WEBER e VINOGRADOV, 2001; GARDNER, 2005).

Hemoglobinas produzidas por bactérias gram negativas aeróbicas em condição de hipoxia tem sido introduzidas em plantas para aumentar o crescimento, produtividade e tolerância a estresses abióticos (ZELASCO et al., 2006; WILHELMSON et al., 2007). Análises por PCR em tempo real de genes relacionados à síntese de hemoglobina em *Lotus japonica* (LjHb1 e LjHb2) mostraram aumento na expressão destes quando da submissão das plantas a situações de hipoxia e baixas temperaturas (SHIMODA et al., 2005).

Em situação de estresse a planta geralmente produz maior quantidade de espécies reativas de oxigênio e espécies nitrogenadas como o óxido nítrico (ON) e a função principal das hemoglobinas nas plantas estressadas relaciona-se ao metabolismo de inativação do ON produzido em situações de estresses biótico e abiótico (LAMOTE et al., 2005). A presença de hemoglobina apenas nas plantas transgênicas observada neste trabalho levanta interessantes questões sobre a relação entre sua maior expressão e o alto acúmulo de prolina livre, principalmente no que se refere aos mecanismos de controle dos efeitos de espécies nitrogenadas e espécies reativas de oxigênio.

4.6.3.2 Géis bi-dimensionais em pH 3-10

Na tentativa de se obter maiores informações biológicas a respeito das proteínas com expressão diferencial devido a inserção do transgene *P5CSF129A* nas plantas de citrumelo 'Swingle', as análises comparativas dos tratamentos CI e TI também foram realizadas a partir de géis 2D com intervalo de pH 3-10. A utilização de intervalo maior de pH possibilita a identificação de um número maior de spots nos géis. Entretanto, os problemas de resolução e sobreposição dos spots, principalmente nas extremidades dos géis, são potencializados.

Os géis obtidos com separação das proteínas na faixa de 3-10 também apresentaram os mesmos problemas de resolução dos spots encontrados nos da faixa de 4-7. Apesar disto, os géis gerados a partir das tiras em pH 3-10 possibilitaram a identificação de mais quatro proteínas com maior expressão nas folhas das plantas transgênicas sob suprimento normal de água em comparação com as plantas controle nas mesmas condições experimentais (Figura 17, Tabela 7).

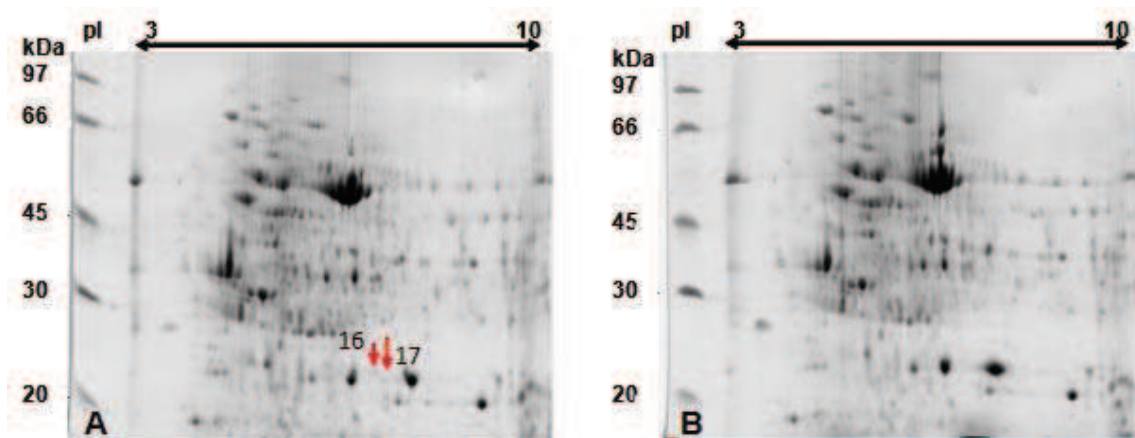


Figura 18 - Comparação da expressão dos spots através de géis 2D referente às proteínas de folhas de citrumelo 'Swingle'. A - Transgênico irrigado (TI). B - Controle irrigado (CI). Primeira dimensão realizada em tiras IPG de 13 cm com pH 3 – 10. Segunda dimensão em géis de poliacrilamida 11%. Proteínas dos spots identificadas em MALDI-TOF-TOF. As setas indicam a presença dos spots apenas nos géis A.

Tabela 7 - Identificação de proteínas em folhas de porta-enxerto citrumelo 'Swingle' controle irrigadas (CI) e transgênicas irrigadas (TI) através de PMF (gel 2D pH 3-10). Dados obtidos a partir de análises em MALDI – TOF – TOF e buscas no Mascot. A expressão qualitativa é indicada pelos sinais + (presença) e – (ausência) de forma isolada. Os valores na coluna de expressão representam as diferenças quantitativas, indicando aumento (+) ou repressão (-) de expressão entre os tratamentos.

Proteína	Spot	Cobertura (%)	MM/pI Teórico	MM/pI experimental	Acesso (NCBI)	Expressão	
						CI	TI
Proteína putativa similar à miraculina- 2	16	46.9	23.6/8.2	25.0/8.5	ABL67650.1	-	+
Proteína putativa similar à miraculina- 2	17	47.1	23.6/8.2	25.0/8.7	ABL67650.1	-	+

4.6.3.2.1 PROTEÍNA PUTATIVA SIMILAR À MIRACULINA

Miraculinas são glicoproteínas originalmente extraídas de frutos da espécie *Richadella dulcifica*, uma planta nativa do oeste africano que ficou conhecida por seus frutos possuírem a distinta capacidade de tornar o sabor amargo dos alimentos em doce (MASUDA et al., 1995; SUN et al., 2006).

O cDNA derivado de tomate (LeMir) possui seqüência similar a que codifica a proteína miraculina e este é rapidamente induzido por nematóide de raiz (*Meloidogyne javanica*), o que tem relacionado a síntese da proteína com mecanismo de tolerância de plantas frente a situação de estresse biótico (BRENNER et al., 1998).

Tsukuda et al. (2006) consideram que as proteínas similares a miraculina desempenham papéis de defesa contra infecção por patógeno em citros, sendo que o mesmo também foi observado por Mondego (2005) estudando café infectado pela lagarta do bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*).

A presença de proteína similar à miraculina detectada apenas nas plantas transgênicas em condição irrigada demonstra que as altas concentrações de prolina podem representar desequilíbrio celular reconhecido pela planta como injúria, e desta forma a expressão desta proteína pode estar relacionada com mecanismo de resposta a estresses bióticos.

5. CONCLUSÕES

- O perfil proteômico de folhas de plantas controle e transgênicas do porta-enxerto citrumelo 'Swingle' em situações irrigada e estressada por déficit hídrico possibilitou a identificação de 17 proteínas diferencialmente expressas entre as comparações estudadas (CI x CE, TI x TE e CI x TI).
- Tanto as plantas controle quanto as transgênicas de citrumelo 'Swingle' submetidas ao déficit hídrico apresentaram redução na expressão qualitativa ou quantitativa na maioria das proteínas identificadas em relação à condição irrigada.
- Ao comparar plantas controle às transgênicas em condições normais de suprimento hídrico, condição que permite analisar a resposta de plantas de citrumelo 'Swingle' ao alto acúmulo de prolina devido à inserção do gene *P5CSF129A*, observou-se um pequeno número de proteínas com expressão diferencial.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o presente trabalho tenha possibilitado a obtenção de informações adicionais acerca dos processos biológicos envolvidos em respostas ao déficit hídrico em citrumelo 'Swingle', a metodologia proteômica ainda possui algumas limitações. Como apenas proteínas com alta expressão nos tecidos são detectadas com precisão, os tratamentos analisados neste trabalho podem ter induzido alterações nos níveis de expressão de determinadas proteínas que não foram detectadas pela técnica. Além disso, algumas proteínas podem ter sua detecção impedida pela superposição de outras proteínas altamente expressas na mesma posição nos géis. Uma alternativa para contornar o problema seria analisar o perfil de expressão de proteínas de compartimentos e estruturas celulares individualizados (mitocôndrias, citosol, cloroplastos, membrana), o que também possibilitaria identificar quais destas teriam maior envolvimento na resposta da planta à seca.

Finalmente, o trabalho possibilitou identificar proteínas relacionadas com respostas ao déficit hídrico em citrumelo 'Swingle' que podem representar alvos para estudos posteriores visando o entendimento dos processos biológicos relacionados ao estresse hídrico, como também sobre o efeito de alto acúmulo de prolina livre nas plantas. As informações proteômicas apresentadas agregadas a conhecimentos de expressão transcricional e de metaboloma podem contribuir com o melhoramento genético e permitir o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca.

7. REFERÊNCIAS

ABBASI, F.M.; KOMATSU, S.A. proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. **Proteomics**, v. 4, p. 2072-2081, 2004.

ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Citros, 2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acesso em 12 agosto, 2007.

AEBERSOLD, R. Constellations in a cellular universe. **Nature**, v. 422, p.115-116, 2003.

AGÜERA, F.; VILLALOBOS, F. J.; ORGAZ, F.; FERNANDEZ-MARTINEZ, J. M. Response to divergent selection for early vigour in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 49, p. 749 -756, 1998.

AGUSTÍ, M. **Citricultura**. Madri: Edicones Mundi-Prensa. p. 416, 2000.

ALI, G.; SRIVASTAVA, P.S.; IQBAL, M. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 89-95, 1999.

ALI, G.M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 396-403, 2006.

ALM, R.; EKEFJARD, A.; KROGH, M.; HAKKINEN, J.; EMANUELSSON, C.; ALVES, M.; FRANCISCO, R.; MARTINS, I.; RICARDO, C. Analysis of lupinus albus leaf apoplastic proteins in response to boron efficiency. **Plant Soil**, v. 279, p. 1-11, 2006.

ANDERSON, J.M.; ANDERSSON, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conservation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, p. 351-355, 1988.

ANGELOPOULOS, K.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 1093-1100, 1996.

ANTONYUK, L.P.; EVSEEVA, N.V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. **Microbiology**, v. 75, p. 470-475, 2006.

APPLEBY, C.A. The origin and functions of haemoglobin in plants, **Science Program**, v. 76, p. 365-398, 1992.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, v. 166, p. 3-16, 2004.

ATIENZA, S.G.; FACCIOLI, P.; PEROTTA, G.; DALFINO, G.; ZSCHIESCHI, W.; HUMBECK, K.; STANKA, M.A.; CATTIVELLI, L. Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. **Plant Science**, v. 167, p. 1359-1365, 2004.

BAE, M.S.; CHO, E.J.; CHOI, E.Y.; PARK, O.K. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. **The Plant Journal**, v. 36, p. 652-663, 2003.

BAGGERMAN, G.; VERLEYEN, P.; CLYNEN, J.; HUYBRECHTS, J.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. Peptidomics. **Journal of chromatography B**, v. 803, p. 3-16, 2003.

BAHRMAN, N.; GOUY, A.; DEVIENNE-BARRET, F.; HIREL, B.; VEDELE, F.; GOUIS, J.L. Differential change in root protein patterns of two wheat varieties under high and low nitrogen nutrition levels. **Plant Science**, v. 168, p. 81-87, 2005.

BARBASSO, D.V. **Caracterização fenológica e físico-química de variedades de tangerinas em três porta-enxertos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Instituto Agrônomo, Campinas, 2005.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 23-58, 2005.

BASSI, R.; SANDONA, D.; CROCE, R. Novel aspects of chlorophyll *a/b*-binding proteins. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 769-779, 1997.

BATES, L.S.; WALDREN, S.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, M.L. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Reviews: TIBTECH**, v.17, p.121-127, 1999.

BLODNER, C.; MAJCHERCZYK, A.; KUES, U.; POLLE, A. Early drought- induced changes to the needle proteome of Norway spruce. **Tree Physiology**, v. 27, p. 1423-1431, 2007.

BOGEAT-TRIBOULOT, M.; BROSCHE, M.; RENAUT, J.; JOUVE, L.; LE THIEC, D.; FAYYAZ, P. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. **Plant Physiology**, v. 143, p. 876-892, 2007.

BOHLMANN, H.; CLAUSEN, S.; BEHNKE, S.; GIESE, H.; HILLER, C.; REIHMAN-PHILIPP, U.; SCHARADER, G.; BARKHOLT, V.; APEL, K. Leaf specific thionins of barley: a novel class of wall proteins toxic to plant pathogenic fungi and possible involved in the defense mechanisms of plants. **Embo Journal**, v. 7, p. 1559-1565, 1988.

BONAMORE, A.; FARINA, A.; GATTONI, M.; SCHININA, M.E.; BELLELLI, A.; BOFFI, A. Interaction with membrane lipids and heme ligand binding properties of *Escherichia coli* flavohemoglobin, **Biochemistry**, v. 42, p. 5792-5801, 2003.

BORSANI, O.; ZHU, J. VERSULES, P.E.; SUNKAR, R.; ZHU, J.K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cisantisense transcripts regulated salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 123, p. 1279-1291, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-54, 1976.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W.; JONES, R.L. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, p. 1158-1203, 2000.

BRENNER, E.D.; LAMBERT, K.N.; KALOSHIAN, I.; WILLIAMSON, V.M. Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. **Plant Physiology** v. 118, p. 237-247, 1998.

BROEKAERT, W.F.; MARIEN, W.; TERRAS, F.R.G.; DE BOLLE, M.F.C.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glicine-rich domain of chitin binding proteins. **Biochemistry**, v. 31, p. 4308-4314, 1992.

CABRAL, GLAUCIA B.; CARVALHO, LUIZ J.C.B. Analysis of proteins associated with storage root formation in cassava using two-dimensional gel electrophoresis. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** , Lavras, v. 13, 2001.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, p. 1-22, 2001.

CAMPOS, J.S. de. **Cultura dos citros**. Campinas, SP, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, p. 100, 1976.

CAMPOS, M.K.F. **Efeitos da prolina em plantas transgênicas de citrumelo ‘Swingle’ submetidas ao déficit hídrico: Relações hídricas, trocas gasosas e atividade de enzimas antioxidantes.** Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2009.

CANNON, S.B.; STERCK, L.; ROMBAUTS, S.; SATO, S.; CHEUNG, F.; GOUZY, J.; WANG, X.; MUDGE, J.; VASDEWANI, J.; SCHIEX, T. et al. Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 14949-14964, 2006.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis, **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CARVALHO, K. **Análise da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em citrumeleiro ‘Swingle’ com alto acúmulo de prolina submetido ao déficit hídrico.** Dissertação mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2009.

CASTLE, W.S.; KREZDORN, A.H. Soil water use and apparent root efficiencies of Citrus trees on four rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 102, p. 403-406, 1977.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECH, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCA, E.; MARÉ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14, 2008.

CAVALCANTI, L.S. et al. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, p. 81-124, 2005.

CAO, S.; JIANG, L.; SONG, S.; JING, R.; XU, G. AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in Arabidopsis. **Cell and Molecular Biology Letters**, v. 11, p. 526-535, 2006.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Agrícola, 2009. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em 12 junho, 2009.

CERQUEIRA, E.C.; NETO, M.T.C.; PEIXOTO, C.P.; FILHO, W.S.S.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, J.G. Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 26, p. 515-519, 2004.

CHANG, C.; STADLER, R. Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. **Bioessays**, v. 23, p. 619-627, 2001.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). **Citrus**: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p. 14-20, 1975.

CHARLESWORTH, D.; LIU, F.L.; ZHANG, L. The evolution of the alcohol dehydrogenase gene family by loss of introns in plants of the genus *Leavenworthia* (Brassicaceae). **Molecular Biology and Evolution**., v. 15, p. 552-559, 1998.

CHARTZOULAKIS, K.; MICHELAKIS, N.; STEFANOUDAKI, E. Water use, growth, yield and fruit quality of 'Bonanza' oranges under different soil water regimes. **Advances in Horticultural Science**, v. 13, p. 6-11, 1999.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30 p. 239–264, 2003.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006

CITROLIMA. Disponível em: < <http://www.citrolima.com.br/>>. Acesso em 5 de abril de 2008.

CLEGG, M.T.; CUMMINGS, M.P.; DURBIN, M.L. The evolution of plant nuclear genes. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 7791-7798, 1997.

COLLETT, H.; SHEN, A.; GARDNER, M.; FARRANT, J.; DENBY, K.; ILLING, N. Towards transcript profiling of desiccation tolerance in *Xerophyta humilis*: construction of a normalized 11 k X. *humilis* cDNA set and microarray expression analysis of 424 cDNAs in response to dehydration. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 39-53, 2004.

COOK, D.; FOWLER, S.; FIEHN, O.; THOMASHOW, M.F. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 15243-1548, 2004.

D'AURIA, J.C. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 331-340, 2006.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Crop production science in horticulture 2: citrus**. Wallingford : CAB International, p. 254, 1994.

DAVIES, H. A role for "omics" technologies in food safety assessment. *Article in press*: **Food Control**, 2009.

DAVIES, P.J. Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. **Martinus Nijhoff**, 1989.

DELAUNEY, A.J.; HU, C.A.; KISHOR, P.B.; VERMA, D.P.S. Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 18673-18678, 1993.

DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DESIKAN, R.; LAST, K.; HARRETT-WILLIAMS, R.; TAGLIAVIA, C.; HARTER, K.; HOOLEY, R.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. **Plant Journal**, v. 47, p. 907-916, 2006.

DHINGRA, V.; GRUPTA, M.; ANDACHT, T.; FU, Z.F. New frontiers in proteomics research: A perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 1-18, 2005.

DIARIO DO NOROESTE, 2008. Disponível em <<http://www.diariodonoroeste.com.br>. Acesso em 15 nov., 2009.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A.H. **Efeito da água no rendimento das culturas**. Tradução: GHEYI, H.R.; SOUZA, A.A.; DAMASCENO, F.A.V.; MEDEIROS, J.F. Campina Grande: UFPB, p.306, 1994.

DORDAS, C. Nonsynbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. **Plant Science**, v. 176, p. 433-440, 2009.

EASTMAN, P.A.; RASHID, A.; CAMM, E.L. Changes of the photosystem 2 activity and thylakoid proteins in spruce seedlings during water stress. **Photosynthetica**, v. 34, p. 201-210, 1997.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária . Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br//>>. Acesso em 15 nov., 2009.

ENGLER, A. Rutaceae. In: Engler, A. Prantl K eds. Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2. Leipzig, Germany: **Auflage**, Engelmann. 19a: p. 187-359, 1931.

FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 13-17, 2002.

FLENGSRUD, R.; KOBRO, G. A method for two-dimensional electrophoresis of protein from green plants tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 177, n. 1, p. 33-36, 1989.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, N. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 343 – 352, 2006.

FOCHESATO, M. L. **Substratos e porta-enxertos na produção de mudas cítricas em ambiente protegido**. 2005. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FOYER, C.H. Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. **Bio Factors**, v. 15, p. 75–78, 2001.

FOYER, C.H.; DESOURVIERES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environment**, v. 17, p. 507-523, 1994.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATO, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M.M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *AREB1* is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 17, p. 3470-3488, 2005.

Fundo de Defesa da Citricultura. Araraquara (FUNDECITRUS). Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em 4 abril, 2009.

FURIHATA, T.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator *AREB1*. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 1988-1993, 2006.

FUSARO, A.F.; SACHETTO-MARTINS, G. Blooming Time for Plant Glycine-Rich Proteins. **Plant Signal and Behavior**, v. 2, p. 386-387, 2007.

GABIUS, H.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biofysica Acta**, v. 19, p. 165-177, 2002.

GARDNER, P.R. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 247-266, 2005.

GARROCHO-VILLEGAS, V.; ARREDONDO-PETER, R. Molecular cloning and characterization of a moss (*Ceratodon purpureus*) nonsymbiotic hemoglobin provides insight into the early evolution of plant nonsymbiotic hemoglobins, **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1482-1487, 2008.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p. 93, 2001.

GIROTTI, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: Reaction pathways, cytotoxic effects and cytoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 63, p. 103-113, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOLDSMITH, M.H.M. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 11442-11445, 1993.

GOLDSPIEL, B.R. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 1105-1255, 1997.

GONÇALVES, L.C. **Reciclagem das cascas da laranja pêra na produção de suplemento alimentar de fibras solúveis (pectina)**. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, João Pessoa, PB: ABES, 2001.

GONZALEZ-BUITRAGO, J.M.; FERREIRA, L.; ISIDORO-GARCIA, M.; SANZ, C.; LORENTE, F.; DAVILA, L. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 385, p. 21-27, 2007.

GRAY, G.R.; HEATH, D. A global reorganization of the metabolome in Arabidopsis during cold acclimation is revealed by metabolome fingerprinting. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 236-48, 2005.

GREEN, B.R., PICHERSKY, E.; KLOPPSTECH, K. Chlorophylla/b-binding proteins: an extended gene family. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 181-186, 1991.

GREFFEN, C.; STADELEA, K.; RUZICKAB, K.; OBRDLIKC, P.; HARTEK, K.; HORAKA, J. Subcellular Localization and In Vivo Interactions of the Arabidopsis thaliana Ethylene Receptor Family Members. **Molecular Plant**, v. 1, p. 308-320, 2008.

GUO, H.; ECKER, J.R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 40-49, 2004

HAJDUCH, M.; CASTEEL, J.E.; TANG, S.; HEARNE, L.B.; KNAPP, S.; THELEN, J.J. Proteomic analysis of near-isogenic sunflower varieties differing in seed oil traits. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 3232-3241, 2007.

HAJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J.W.; THELEN, J.J. A Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1397-1419, 2005.

HAIJHEIDARI, M.; ABDOLLAHIAN-NOGHABI, M.; ASKARI, H.; HEIDARI, M.; SADEGHIAN, S.Y.O. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, v. 5, p. 950-60, 2005.

HAIJHEIDARI, M.; EIVAZI, A.; BUCHANAN, B.B.; WONG, J.H.; MAJIDI, I.; SALEKDEH, G.H. Proteomics uncovers a role for redoxin drought tolerance in wheat. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 1451-60, 2007.

HAKALA, M.; TUOMINEN, I.; KERÄNEN, M.; TYYSTJÄRVI, T.; TYYSTJÄRVI, E. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1706, p. 68-80, 2005.

HALL et al. Ethylene Receptors: Ethylene Perception and Signal Transduction. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 118-130, 2007.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79–102, 1997.

HASEGAWA, P.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HASSE, G. **A laranja no Brasil**. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987.

HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics – putting green genomes to work. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 471-482, 2003.

HEUER, B. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. **Plant Science**, v. 165, p. 693-699, 2003.

HOECKER, N.; LAMKEMEYER, T.; SARHOLZ, B.; PASCHOLD, A.; FLADERER, C.; MADLUNG, J. Analysis of nonadditive protein accumulation in young primary roots of a maize (*Zea mays* L.) F(1)-hybrid compared to its parental inbred lines. **Proteomics**, v. 8, p. 3882–3894, 2008.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1129-1136, 2000.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 813-824, 2008.

HOY, J.A.; HARGROVE, M.S. The structure and function of plant hemoglobins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 371-379, 2008.

HSU, S.Y.; HSU, Y.T.; KAO, C.H. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 73-78, 2003.

IAC – Instituto Agronômico de Campinas, 2006. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acesso em 21 setembro, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 29/09/08.

INGLE, R.A.; SCHMIDT, U.G.; FARRANT, J.M.; THOMSON, J.A.; MUNDREE, S.G. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Plant Cell Environment**, v. 30, p. 435-446, 2007.

JALEEL, C.A.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; PANNEERSELVAM, R. Paclobutrazol influences vegetative growth and floral characteristics of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, **Indian Journal of Applied and Pure Biology**. v. 21, p. 369-372, 2006.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 7-11, 2007.

JAYAKUMAR, K.; JALEEL, C.A.; VIJAYARENGAN, P. Changes in growth, biochemical constituents and antioxidant potentials in radish (*Raphanus sativus* L.) under cobalt stress, **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 112-117, 2007.

JIANG, G.; WANG, Z.; SHANG, H.; YANG, W.; HU, Z.; PHILIPS, J.; DENG, X. Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. **Planta**, v. 225, p. 1405-1420, 2007.

JIANG, O.; CHEN, H.; PAN, X.; PAN, Q.; SHI, Y.; LI, X.; ZHANG, G.; WANG, Y.; XIE, S.; SHEN, S. Proteomic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrid necrosis. **Plant Science**, v. 175, p. 394-401, 2008.

JOHNSON, M.P.; HAVAUX, M.; TRIANTAPHYLAKIDES, C.; KSAS, B.; PASCAL, A.A.; ROBERT, B.; DAVISON, P.A.; RUBAN, A.V.; HORTON, P. Elevated Zeaxanthin Bound to Oligomeric LHCII Enhances the Resistance of *Arabidopsis* to Photooxidative Stress by a Lipid-protective, Antioxidant Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 22605-22618, 2007.

JORRIN, J.V.; MALDONADO, A.M.; CASTILLEJO, M.A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, v. 7, p. 2947-2962, 2007.

JORRÍN-NOVO, J.V.; MALDONADO, A.M.; ZOMENO, S.E.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M.A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAIER, B.; DONOSO, G.; INMACULADA, R. Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 285-314, 2009.

KAMIYA, M.; SHEN, J.R. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 98-103, 2003.

KAVI KISHOR, P.B.; HONG, Z.L.; MIAO, G.H.; HU, C.A.A.; VERMA, D.P.S. Overexpression of DELTA 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387-1394, 1995.

KAVI KISHORE, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N.; LAXMI, P.S.; NAIDU, K.R.; RAO, K.R.S.S.; RAO, S.; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N.

Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**. v. 88, p. 424-438, 2005.

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 17 nov. 2006.

KIM, J.S. et al. Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 55, p. 455-466, 2008.

KIM, Y.O.; KANG, H. The role of a zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein during the cold adaptation process in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, p. 793-798, 2006.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rígel, p. 446, 1994.

KOMATSU, S., KONISHI, H., SHEN, S. AND YANG, G. Rice proteomics: a step functional analysis of the rice genome. Mol. Cell. **Proteomics**, v. 2, p. 2-10, 2003.

KOMATSU, S.; AHSAN, N. Soybean proteomics and its application to functional analysis. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 325-336, 2009.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego : Academic, p. 495, 1995.

KUMAR, M.S.; GOVIND, G.; KANG, LI.; MYSORE, K.S.; UDAYAKUMAR, M. Functional characterization of *Nicotiana benthamiana* homologs of peanut water deficit-induced genes by virus-induced gene silencing. **Planta**, v. 225, p. 523-539, 2007.

KUMUTHA, D.; SAIRAMA, R.K.; EZHILMATHI, K.; CHINNUSAMY, V.; MEENA, R.C. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): Upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. **Plant Science**, v. 175, p. 706-716, 2008.

KWAK, K.J.; KIM, Y.O.; KANG, H. Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3007-3016, 2006.

LAEMMLI, U. K. **Nature**, v. 222, p. 680-685, 1970.

LAMOTTE, O.; COURTOIS, C.; BARNAVON, L.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. Nitric oxide in plants: The biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. **Planta**, v. 221, p. 1-4, 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: Rima, p. 531, 2000

LAWLOR, D.W. The effects of water deficit on photosynthesis. In: **Smirnoff, N.** (ed), Environmental and plant metabolism-flexibility and acclimation, p.129-160. Bios Scientific Publisher, Oxford, 1995.

LEDO, A. S.; LEDO, J.S.; RITZINGER, R.; SOBRINHO, A.P.C. Porta-enxerto para laranjeiras-doces (Citrus sinensis (L.) Osb.), em Rio Branco, Acre). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, 1999.

LEHESRANTA, S.J.; DAVIES, H.V.; SHEPHERD, V.T.; NUNAN, N.M.C.; NICOL, J.W.; AURIOLA, S.; KOISTINEN, K.M.; SUOMALAINEN, S.; KOKKO, H.I.; KARENLAMPI, S.O. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, Landraces, and genetically modified lines. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1690-1699, 2005.

LEOPOLD, A.C.; KRIEDEMANN, P.E. **Plant Growth and Development**. McGraw - Hill, p. 545, 1975.

LESLEY, S.A. High-Throughput Proteomics: Protein Expression and Purification in the Postgenomic World. **Protein Expression and Purification** v. 22, p. 159-164, 2001.

LIMA, M. G.S.; LOPES, N.F.; BACARIN, M.A.; MENDES, C.R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, Campinas, v. 63, p. 335-340, 2004.

LIPTON, M.S.; PASA-TOLIC', L.; ANDERSON, G.A.; ANDERSON, D.J.; AUBERRY, D.L.; BATTISTA, J.R.; DALY, M.J.; FREDRICKSON, J.; HIXSON, K.K.; KOSTANDARITHES, H.; MASSELON, C.; MARKILLIE, L.M.; MOORE, R.J.; ROMINE, M.F.; SHEN, Y.; STRITMATTER, E.; TOLIC', N.; UDSETH, H.R.; VENKATESWARAN, A.; WONG, K.K.; ZHAO, R.; SMITH, R.D. Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 11049-11054, 2002.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 191-202, 1999.

LORENTE, F.; DAVILA, I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 385, p. 21-27, 2007.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.

LORKOVIC, Z.J.; BARTA, A. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 623-635, 2002.

MABBERLEY, D.J. A classification for edible *Citrus*. **Telopea** v. 7, p. 167-172, 1997.

MACHADO, E. C. et al. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira 'Natal'. **Bragantia**, v. 66, n.3, p. 373-379, 2007.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J. I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M. L.; HASEGAWA, P. M.; JOLY, R. J.; BRESSAN, R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal**, v. 31, p. 699-712, 2002.

MALIK, N.S.A.; BRADFORD, J.M. A simple protein extraction method for proteomic studies on olive leaves. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. v. 3, 2005.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K.M. Artifacts associated with 2-mercaptoethanol upon high resolution two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Analytical Biochemistry**, v. 139, p. 502-505, 1984.

MASERTI, B.E.; DELLA CROCE, C.M.; LURO, F.; MORILLON, R.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L. A general method for the extraction of citrus leaf proteins and separation by 2D electrophoresis: A follow up. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p. 351-356, 2007.

MASUDA, Y.; NIRASAWA, S.; NAKAYA, K.; KURIHARA, Y. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein miraculin. **Gene**, v. 161, p. 175-177, 1995.

MAZARO, S.M.; CITADIN, E.; GOUVEA, A.; LUCKMAN, D.; GUIMARÃES, S.M. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciencia Rural**, v. 38, 2008.

MECHIN, V.; CONSOLI, L.; GUILLOUX, M.L.; DAMERVAL, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics**, v. 3, p. 1299-1302, 2003.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira 'Valencia' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' e Trifoliata submetidos à deficiência hídrica. **Bragantia** v. 57, p. 15-22, 1998.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira 'Valência' sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 29-34, 1999.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; FILHO, J.C.B.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGGI, M.; JUNIOR, R.P.L.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p. 1375-1381, 2004.

MONDEGO, J.M.C. **Caracterização de genes de café (*coffea sp.*) induzidos durante a infestação do bicho mineiro (*leucoptera coffeella*)**. Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MORI, I.C.; MURATA, Y.; YANG, Y.; MUNEMASA, S.; WANG, Y.F.; ANDREOLI, S.; TIRIAC, H.; ALONSO, J.M.; HARPER, J.F.; ECKER, J.R. et al. *CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure*. **PLoS Biology**, v. 4, p. 327, 2006.

NATARAJAN, S.; XU, C.; CARPENA, T.J.; GARRETT, W.M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 342, p. 214-220, 2005.

NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, 2007.

NEVES, M. F.; JANK, M.S. (Org.) Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: **A agenda 2015**. PENSA/USP/ICONE, São Paulo, 2006.

NOGUEIRA, R.J.M.C. **Expressões fisiológicas da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) em condições adversas**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos-SP, p. 207. Tese Doutorado, 1997.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OELJEKLAUS S.; HELMUT, E.M.; BETTINA, W. Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. **Journal of Proteomics**. v. 72, p. 545-554, 2009.

OHNISHI, N.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; TAKAHASHI, S.; HIGASHI, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step one occurs at the oxygen-evolving complex and step two occurs at the photochemical reaction center. **Biochemistry**, v. 44, p. 8494-8499, 2005.

ORTOLANI, A. et al. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 153-195.

ORTOLANI, A.A.; CAMARGO, M.B.P. Influência dos fatores climáticos na produção. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, p. 71-100, 1987.

OSAKABE, Y.; MARUYAMA, K.; SEKI, M.; SATOU, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. An LRR receptor kinase, RPK1, is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 17, p. 1105-1119, 2005.

OZTURK, L.; DEMIR, Y. In vivo and in vitro protective role of proline. **Plant Growth Regulation**, v. 38, p. 259-264, 2002.

PAPDI, C.; ABRAHAM, E.; JOSEPH, M.P.; POPESCU, C.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Functional Identification of Arabidopsis Stress Regulatory Genes Using the Controlled cDNA Overexpression System. **Plant Physiology**, v. 147, p. 528-542, 2008.

PAPPIN, D.J.; HOJRUP, P.; BLEASBY, A.J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Current Biology**, v. 3, p. 327-332, 1993.

PARKER, R.; FLOWERS, T.J.; MOORE, A.L.; HARPHAM, N.V.J. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1109-1118, 2006.

PASSIOURA, J.B. Drought and drought tolerance. In: BELHASSEN, I. (Ed.). Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological, and molecular biological analysis. **Kluwer Academic**, p.1-7, 1997.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Org.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico/FUNDAG, p. 63-104, 2005.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.C.P.; POMPEU JÚNIOR, J., *et al.* **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas : Fundação Cargill, v. 1, p. 265-280, 1991.

POMPEU JUNIOR, J. Cuidados no uso do Citrumelo Swingle. **Revista Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 3, n.13, p. 7, 1999.

POMPEU JÚNIOR, J.; SALVA, R.; BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, p. 413-422, 2004.

PORTIS, A.R.; LI, C.; WANG, D.; SALVUCHI, M.E. Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1597-1604, 2007.

PURSIHEIMO, S.; MULO, P.; RINTAMÄKI, E.; ARO, E.M. Coregulation of light-harvesting complex II phosphorylation and Lhcb mRNA accumulation in winter rye. **Plant Journal**, v. 26, p. 317-327, 2001.

RABBANI, M.A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1755-1767, 2003.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 758-760, 1998.

RABINOWICZ, P.D.; CITEK, R.; BUDIMAN, M.A.; NUNBERG, A.; BEDELL, J.A.; LAKEY, N.; O'SHAUGHNESSY, A.L.; NASCIMENTO, L.U.; MCCOMBIE, W.L.; MARTIENSSEN, R.A. Differential methylation of genes and repeats in land plants. **Genome Research**, v. 15, p. 1431-1440, 2005.

RAINS, D.W. Plant tissue and protoplast culture: application to stress physiology and biochemistry. In: Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B. (Eds.), *Plants Under*

Stresses: **Biochemistry, Physiology and Ecology and their Application to Plant Improvement**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 181-196, 1989.

RAYMOND, J.; BLANKENSHIP, R.E. Biosynthetic pathways, gene replacement and the antiquity of life. **Geobiology**, v. 2, p. 199-203, 2004.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; DEVIENNE, D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1253-1263, 1998.

RINALDI, A.C.; BONAMORE, A.; MACONE, A.; BOFFI, A.; BOZZI, A.; DIGIULIO, A. Interaction of vitreoscila hemoglobin with membrane lipids. **Biochemistry**, v. 45, p. 4069-4076, 2006.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANNOONI, J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, S.R. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **Plant Journal**, v. 39, p. 715-733, 2004.

RYAN, C.A. Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; FENG, Q.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**, v. 18, p. 1292-1309, 2006.

SALEKDEH, G.H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, v. 7, p. 2976-2996, 2007.

SALEKDEH, G.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNET, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, v. 2, p. 1131-1145, 2002.

SALEKDEH, G.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. **Field Crops Research**, v. 76, p. 199-219, 2002.

SALEKDEH, G.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics** v. 2, p. 1131-45, 2002.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, p. 287-294, 1998.

SARADHI, P.P.; ALIA, J.M.; ARORA, S.; PRASAD, K.V.S.K. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 209, p. 1-5, 1995.

SARAVANAN, R.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p. 2522-2532, 2004.

SAZ, J.M.; MARINA, M.L. High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 431-451, 2007.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHÄFER, G.; DORNELLES, A.L.C. Produção de mudas cítricas no Rio Grande do Sul - Diagnóstico da região produtora. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 587-592, 2000.

SCHÄFER, G.; GEN, N.V.P.; SARTORI, I.A.; SCHWARZ, S.F.; KOLLER, O.C. Produção e desenvolvimento da tangerineira-‘montenegrina’ propagada por

enxertia e estaquia, no rio grande do sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, p. 668-672, 2001.

SCHONING, J.C.; STREITNER, C.; MEYER, I.M.; GAO, Y.; STAIGER, D. Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, p. 1-11, 2008.

SCHOBERT, B.; TSCHESCHE, H. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 541, p. 270-277, 1978.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T. et al.: Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high salinity stresses using a full length cDNA microarray. **Plant Journal**, v. 31, p. 279-292, 2002.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 296-302, 2007.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant Cell Environment**, v. 25, p. 333-341, 2002.

SHAO, H.B.; CHEN, X.Y.; CHU, L.Y.; ZHAO, X.N.; WU, G.; YUAN, Y.B.; ZHAO, C.X.; HU, Z.M. Investigation on the relationship of Proline with wheat anti-drought under soil water deficits, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 113-119, 2006.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y. Plant molecular biology in China: Opportunities and challenges, **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, p. 345-358, 2005.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; LU, Z.H.; KANG, C.M. Main antioxidants and redox signaling in higher plant cells, **International Journal of Biological Sciences**, v. 44, p. 12-18, 2008a.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; ZHAO, C.X. Progress in plant aquaporin structure-function relationships, **Molecular Membrane Biology**, *in press*, v. 25, 2008b.

SHAO, H.B.; GUO, Q.J.; CHU, L.Y.; ZHAO, X.N.; SU, Z.L.; HU, Y.C.; CHENG, J.F. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, p. 37-45, 2007.

SHEN, S.; JING, Y.; KUANG, T. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. **Proteomics**, v. 3, p. 527-535, 2003.

SHEVYAKOVA, N.I. Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. **Soviet Plant Physiology**, v. 30, p. 597-608, 1984.

SHI, J.X.; CHEN, S.; GOLLOP, N.; GOREN, R.; GOLDSCHMIDT, E.E.; PORAT, R. Effects of anaerobic stress on the proteome of citrus fruit. **Plant Science**, v. 175, p. 478-486, 2008.

SHIMODA, Y.; NAGATA, M.; SUZUKI, A.; ABE, M.; HIGASHI, S.; UCHIUMI, T. Involvement of nonsymbiotic hemoglobin in *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis, **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 592, 2005.

SINCLAIR, T.R.; ALLEN, L.H. Carbon dioxide and water vapour exchange of leaves on field-grown citrus trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 33, p. 1166-1175, 1982.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessiccation. **New Phytologist**, v. 125, p. 27-58, 1993.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SOUZA, M.J.H.; RAMOS, M.M.; SIQUEIRA, D.L. The water stress and the production time in 'Tahiti' lime. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 8, p. 31-38, 2004.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. Reproductive physiology: flowering and fruiting. In: **Biology of citrus**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 70-125, 1996.

SPURLING, M.B. Citrus in the Pacific area. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1968. Riverside. **Proceedings**. Riverside, CA: University of California, 1969. v. 1, p. 93-101.

STEWART, G.R.; LEE, J.A. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, v. 120, p. 279-289, 1974.

STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C., SEMPIONATO, O.R. Yield and fruit quality of 'Pêra' sweet orange clone IAC on 16 rootstocks in Bebedouro region, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 359-362, 2004.

SUN, H.; CUI, M.; MA, B.; EZURA, H. Functional expression of taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. **FEBS**, v. 580, p. 620-626, 2006.

SWEETLOVE, L.J.; HEAZLEWOOD, J.L.; HERALD, V.; HOLTZAPFFEL, R.; DAY, D.A.; LEAVER, C.J.; MILLAR, A.H. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. **The Plant Journal**, v. 32, p. 891-904, 2002.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its relatives. Revisão de Philip C. Reece. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley, California: University of California, v.1, p. 190-430, 1967.

SYVERTSEN, J.P.; LLOYD, J.J. Citrus. In: Schaffer, B.A.; Andersen, P.C. Handbook of environmental physiology of fruit crops, vol II. Subtropical and tropical crops. CRC Press, Boca Raton, p. 65-99, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, p. 792, 1998.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 29, p. 417-426, 2002.

TAKIMOTO C.H.; CALVO, E. **"Principles of Oncologic Pharmacotherapy"** in PAZDUR, R.; WAGMAN, L.D.; CAMPHAUSEN, K.A.; HOSKINS, W.J. (Eds) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. n. 11, 2008.

TANAKA, T. Citrologia, semi-centennial commemoration papers on *Citrus* studies. **Citrologia Supporting Foundation**, p. 114, 1961.

TANG, Y.; WEN, X.; LU, Q.; YANG, Z.; CHENG, Z.; LU, C. Heat Stress Induces an Aggregation of the Light-Harvesting Complex of Photosystem II in Spinach Plants. **Plant Physiology**, v. 143, p. 629-638, 2007.

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **Plant Cell, Rockville**, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

THELEN, J.J.; PECK, S.C. Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. **Plant Cell**, v. 19, p. 3339-3346, 2007.

THORNTON, L.E.; OHKAWA, H.; ROOSE, J.L.; KASHINO, Y.; KEREN, N.; PAKRASI, H.B. Homologs of plant PsbP and PsbQ proteins are necessary for regulation of photosystem II activity in cyanobacterium *Synechocystis*. **Plant Cell**, v. 16, p. 2164-2175, 2004.

TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; MARTIN, Z.J. **Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas**. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, p. 85, 1995.

TOPP, G.C; DAVIS, J.L.; ANNAN, A.P. Electromagnetic determination of soil water content: measurement in coaxial transmission lines. **Water Resources Research**, v. 16, p. 574-582, 1980.

TSUKUDA, S.; GOMI, K.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p. 125-136, 2006.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17: p. 113-122, 2006.

UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; MARUYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, p. 17306-17311, 2004.

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2002/unihoje_ju196pag08.html. Acesso em 16 jul. 2007

VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

VASCONCELLOS, L.A.B.C.; CASTLE, W.S. Trunk xylem anatomy of mature healthy and blighted grapefruit trees on several rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 119 p. 185-194, 1994.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, 2008.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2369-2375, 2003.

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds). **The Citrus Industry**, Berkeley, University of California Press, v.1, p.1-39. 1967.

WEBER, R.E.; VINOGRADOV, S.N. Non-vertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations, **Physiological Reviews**, v. 81, p. 569-628, 2001.

WERNER, J.E., FINKELSTEIN, R.R.. Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiological Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 913-922, 1995.

WILHELMSON, A.; KALLIO, P.T.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; NUUTILA, A.M. Heterologous expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in barley (*Hordeum vulgare*), **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1773-1783, 2007.

WILKINS, M.R.; HOCHSTRASSER, D.F. **Thinking bigproteome studies in a postgenome era**. Disponível em: <<http://www.abrf.org/Proteome.html>> Acesso em 02 set. 2008.

WILLIAMSON, J.G.; MAUST, B.E. Forcing treatment and rootstock effect budbreak and growth of containerized *Citrus* nursery trees. **Horticultural Technology**, Alexandria, v. 6, p. 134-137, 1996.

WONG, C.E.; LI, Y.; LABBE, A.; GUEVARA, D.; NUIN, P.; WHITTY, B.; DIAZ, C.; G. GOLDING, B.G.; GRAY, R.; WERETILNYK, E.A.; GRIFFITH, M.; MOFFATT, B.A. Transcriptional Profiling Implicates Novel Interactions between Abiotic Stress and Hormonal Responses in *Thellungiella*, a Close Relative of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1437-1450, 2006.

WURGLER-MURPHY, S.M.; SAITO, H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. **Trends in Biochemical Science**, v. 22, p. 172-176, 1997.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 88-94, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p.781-803, 2006.

YAN, Q.; JIANG, Z.; YANG, S.; DENG, W.; HAN, L.A. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, p. 72-81, 2005.

YOKOYAMA, S.; YOKOYAMA, R.; KINLAW, C.S.; HARRY, D.E. Molecular evolution of the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, p. 143-154, 1990.

YU, J.; WANG, J.; LIN, W.; LI, S.; ZHOU, J.; NI, P.; DONG, W.; HU, S.; ZENG, C.; ZHANG, J. et al. The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. **PLoS Biology**, v. 3, p. 38, 2005.

ZELASCO, S.; REGGI, S.; CALLIGARI, P.; BALESTRAZZI, A.; BONGIORNI, C.; QUATTRINI, E.; DELIA, G.; BISOFFI, S.; FOGHER, C.; CONFALONIERI, M. Expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb)-encoding gene in transgenic white poplar: plant growth and biomass production, biochemical characterization and cell survival under submergence, oxidative and nitrosative stress conditions, **Molecular Breeding**, v. 17, p. 201-216, 2006.

ZHANG, J.; MA, H.; CHEN, S.; PERL, A.; KOVACS, L.; CHEN, S. Stress response proteins differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon – A proteomic approach. **Plant Science**, v. 177, p. 103-113, 2009.

ZHAO, X.C.; SCHALLER, G.E. Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor *ETR1* in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v. 562, p. 189-192, 2004.

ZHOU, H.; RANISH, J.A.; WATTS, J.D.; AEBERSOLD, R. Quantitative Proteome Analysis by Solid-Phase Isotope Tagging and Mass Spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 512-515, 2002.

ZOMENO, S.E.; ARIZA, D.; JORGE, I.; LENZ, C.; CAMPO, A.; JORRIN, J.V.; NAVARRO, R.M. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 233-245, 2009.